



SKRIPSI - TK 141581

**HIDROLISIS TRIGLISERIDA PADA FRAKSI NON
POLAR DARI MINYAK NYAMPLUNG
MENGUNAKAN *RHIZOPUS ORYZAE* DAN
*LACTOBACILLUS PLANTARUM***

**Amirut Tahfifah
NRP. 2314 105 023**

**Hilda Dwi Lestari
NRP. 2314 105 026**

**Dosen Pembimbing
Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D
NIP. 1976 03 23 2002 12 1001**

**JURUSAN TEKNIK KIMIA
FAKULTAS TEKNOLOGI INDUSTRI
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA 2016**



SKRIPSI – TK141581

**HIDROLISIS TRIGLISERIDA PADA FRAKSI NON
POLAR DARI MINYAK NYAMPLUNG
MENGUNAKAN *RHIZOPUS ORYZAE* DAN
*LACTOBACILLUS PLANTARUM***

Oleh:

Amirut Tahfifah

NRP. 2314 105 023

Hilda Dwi Lestari

NRP. 2314 105 026

Dosen Pembimbing :

Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D

NIP. 1976 03 23 2002 12 1001

JURUSAN TEKNIK KIMIA

FAKULTAS TEKNOLOGI INDUSTRI

INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER

SURABAYA

2016



FINAL PROJECT – TK141581

**TRIACYLGLYCEROLS HYDROLYSIS FROM NON
POLAR FRACTION OF NYAMPLUNG (*CALOPHYLLUM
INOPHYLLUM*) OIL USING *RHIZOPUS ORYZAE* AND
*LACTOBACILLUS PLANTARUM***

By:

Amirut Tahfifah

NRP. 2314 105 023

Hilda Dwi Lestari

NRP. 2314 105 026

Advisor:

Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D

NIP. 1976 03 23 2002 12 1001

**CHEMICAL ENGINEERING DEPARTMENT
FACULTY OF INDUSTRIAL TECHNOLOGY
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA 2016**

LEMBAR PENGESAHAN

HIDROLISIS TRIGLISERIDA PADA FRAKSI NON POLAR DARI MINYAK NYAMPLUNG MENGUNAKAN *RHIZOPUS ORYZAE* DAN *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

Diajukan untuk memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar
Sarjana Teknik pada Program Studi S-1 Jurusan Teknik Kimia
Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya

Oleh:

Amirut Tahfifah NRP. 2314 105 023
Hilda Dwi Lestari NRP. 2314 105 126

Disetujui oleh Tim Penguji Tugas Akhir:

1. Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D. (Pembimbing)
2. Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng. (Penguji I)
3. Dr. Sri Rachmania Juliastuti, M.Eng (Penguji II)
4. Hakun Wirawasista A, S.T., M.M.T. (Penguji III)



Surabaya,
Juli, 2016

**HIDROLISIS TRIGLISERIDA PADA FRAKSI NON
POLAR DARI MINYAK NYAMPLUNG MENGGUNAKAN
RHIZOPUS ORYZAE DAN LACTOBACILLUS
PLANTARUM**

Nama Mahasiswa : 1. Amirut Tahfifah (2314 105 023)
2. Hilda Dwi Lestari (2314 105 026)

Dosen Pembimbing : Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D.
Jurusan : Teknik Kimia FTI-ITS

ABSTRAK

Minyak dari biji Calophyllum inophyllum (nyamplung) umumnya hanya digunakan sebagai bahan baku biodiesel, padahal terdapat banyak manfaat yang lain. Fraksi lipid non polar pada minyak Calophyllum inophyllum mengandung trigliserida tinggi dan beberapa komponen bioaktif. Trigliserida dapat dihidrolisis untuk mendapatkan asam-asam lemak penyusunnya dan gliserol. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh jenis mikroorganisme penghasil enzim (whole-cell) pada reaksi hidrolisis trigliserida, mengetahui pengaruh jumlah mikroorganisme penghasil enzim (whole-cell) pada reaksi hidrolisis trigliserida, dan mengetahui pengaruh waktu pada reaksi hidrolisis trigliserida. Minyak nyamplung diekstraksi multi stage sebanyak 8 kali, rasio pelarut terhadap minyak 5:1 (g/g), dan rasio pelarut Petroleum eter-methanol 3:1 (g/g). NPLF yang didapat kemudian dianalisa kandungan trigliserida, digliserida, monogliserida dan FFA. Mikroorganisme yang digunakan adalah R.oryzae tanpa melalui rekayasa genetika ditanam dan Lactobacillus plantarum. Proses hidrolisa dilakukan dengan menambahkan air dengan perbandingan NPLF:air sebesar 1:3(g/g) dan mikroorganisme sesuai variable. Variabel R.oryzae yang diberikan adalah 10^{12} sel/mL mixture, 5×10^{12} sel/mL mixture, dan 10×10^{12} sel/mL mixture. Campuran tersebut dimasukkan pada inkubator shaker pada suhu 30°C , kecepatan 150 rpm selama 1 hari, 2 hari, 3 hari, 4 hari, dan 5 hari. NPLF dan fraksi minyak hasil hidrolisis akan dianalisa secara kualitatif menggunakan TLC dan spektrofotometri UV-Vis. Kadar trigliserida, digliserida, dan monogliserida dianalisa menggunakan metode kolom kromatografi. Untuk analisa

trigliserida, setelah metode kolom kromatografi dilanjutkan dengan titrasi oksidialkalimetri lalu menggunakan spektrofotometri panjang gelombang 285 nm. Sedangkan kadar FFA dianalisa secara kuantitatif menggunakan metode titrasi asidi-alkalimetri. Hasil percobaan ekstraksi likuid-likuid minyak nyamplung memiliki kandungan sebagai trigliserida sebesar 94%, digliserida sebesar 2,01%, monogliserida sebesar 0,37%, dan FFA sebesar 3,43%. Dari hasil hidrolisa dapat diketahui bahwa pada saat kadar FFA (free fatty acid) < 1% dan kadar digliserida < 0,45% akan terjadi proses hidrolisa. Kesimpulan dari penelitian yang telah dilakukan antara lain: penggunaan *R. Oryzae* lebih efektif dibandingkan *L. Plantarum* untuk proses hidrolisa trigliserida dari NPLF minyak nyamplung. Jumlah whole-cell microbial tidak berpengaruh pada proses. Lama waktu hidrolisa akan mempengaruhi kadar FFA (free fatty acid) yang terbentuk karena semakin lama proses hidrolisa dapat menyebabkan adanya reaksi balik ataupun reaksi esterifikasi, sehingga kadar trigliserida akan naik dan kadar FFA justru turun.

Kata Kunci : Nyamplung, Hidrolisis, *Rhizopus oryzae*, *Lactobacillus plantarum*, FFA, Non Polar Lipid Fraction, Whole-cell.

**TRIACYLGLYCEROLS HYDROLYSIS FROM NON
POLAR FRACTION OF NYAMPLUNG (*CALOPHYLLUM
INOPHYLLUM*) OIL USING *RHIZOPUS ORYZAE* AND
*LACTOBACILLUS PLANTARUM***

Name : 1. Amirut Tahfifah(2314 105 023)
2. Hilda Dwi Lestari(2314 105 026)

Academic Lecturer : Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D.
Department : Chemical Engineering FTI-ITS

ABSTRACT

Oil from the seeds of *Calophyllum inophyllum* (nyamplung) is generally only used as raw material for biodiesel, but there are many other benefits beside it. Non polar lipid fraction in *Calophyllum inophyllum* oil contains high triglycerides and several bioactive components. Triglycerides can be hydrolyzed to obtain constituent fatty acids and glycerol. This study aims to determine the effect of microorganisms type for producing enzymes using whole-cell biocatalyst on triglyceride hydrolysis reaction, knowing the effect of the number of mikorganisme producing enzymes whole-cell biocatalyst on the hydrolysis of triglycerides, and determine the effect of time on the hydrolysis of triglycerides. Purification of Nyamplung oil is using multi stage oil extracted 8 times, solvent to oil ratio is 5: 1 (g / g), and the ratio of solvent Petroleum ether-methanol is 3: 1 (g / g). Non polar lipid fraction were obtained and then analyzed the content of triglycerides, diglycerides, monoglycerides and FFA. The microorganism used are *Rhizopus oryzae* grown without genetic engineering and *Lactobacillus plantarum*. Hydrolysis process is done by adding water at a ratio of NPLF:water is 1: 3 (g / g) and microorganisms corresponding variable. Number of *R.oryzae* and *L.plantarum* given are 10^{12} cells/mL mixture, 5×10^{12} cells/mL mixture, and 10×10^{12} cells/mL mixture. The mixture was put in an incubator shaker at a temperature of 30°C , speed 150 rpm for 1 day, 2 days, 3 days, 4 days, and 5 days. NPLF and oil fractions hydrolysis results will be analyzed qualitatively using TLC and UV-Vis spectrophotometry. High levels of triglycerides, diglycerides, monoglycerides and analyzed using column chromatography. For analysis of triglycerides, after the method

of column chromatography followed by oksidialkalimetri titration and use spectrophotometric wavelength of 285 mμ. While the quantitative levels of FFA were analyzed using acid-base titratio. The experimental results of liquid-liquid extraction nyamplung oil contains as triglycerides 94%, diglycerides 2.01%, monoglycerides 0.37% and 3.43% FFA. From the result of hydrolysis known that if FFA (free fatty acid) value is <1% and diglycerides is <0.45%, hydrolysis process will occur. The conclusion of the research that has been done are: *R.Oryzae* more effective than *L.Plantarum* for triglyceride hydrolysis process of NPLF nyamplung oil. The number of whole-cell microbial have no effect on the process. The length of time of hydrolysis would affect the levels of FFA (free fatty acid) which is formed because the longer the hydrolysis process can cause a reverse reaction or esterification reaction, so that triglyceride levels will incrise and the FFA will decrease.

Keywords: Hydrolysis, *Rhizopus oryzae*,
Lactobacillus plantarum, FFA, Non Polar Lipid
Fraction, Whole-cell.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji bagi Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya berupa kesehatan akal, jasmani dan rohani kami dapat menyelesaikan Laporan Skripsi kami dengan judul **“HIDROLISIS TRIGLISERIDA PADA FRAKSI NON POLAR DARI MINYAK NYAMPLUNG MENGGUNAKAN *RHIZOPUS ORYZAE* DAN *LACTOBACILLUS PLANTARUM*”**. Laporan Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan program studi Strata-1 di Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS.

Selama penyusunan Laporan Skripsi ini, kami banyak sekali mendapat bimbingan, dorongan, serta bantuan dari banyak pihak. Untuk itu, kami ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak Juwari, ST ., M.Eng selaku Ketua Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS Surabaya.
2. Bapak Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D selaku Dosen Pembimbing yang selalu meluangkan waktu untuk memberikan saran, bimbingan dan dukungan kepada kami.
3. Bapak Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng selaku Kepala Laboratorium Teknologi Biokimia
4. Bapak Dr.Ir. Sri Rahmania Juliastuti, ST, M.Eng selaku penguji skripsi kami
5. Bapak Hakun Wirawasista A., ST., MMT selaku penguji skripsi kami
6. Bapak dan Ibu Dosen Pengajar yang telah memberikan ilmuya serta seluruh karyawan Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS Surabaya.
7. Orang tua serta saudara-saudara kami atas doa, dukungan, bimbingan, perhatian dan kasih sayang yang selalu tercurah selama ini.
8. Teman-teman seperjuangan Biokim *Crew*

Kami menyadari bahwa penulisan laporan ini masih banyak kekurangan dan jauh dari sempurna, oleh karena itu kami sangat mengharapkan saran dan masukan yang membangun demi kesempurnaan laporan ini.

Surabaya, 11 Juli 2016

Penyusun

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
LEMBAR PENGESAHAN	
ABSTRAK	i
ABSTRACT	iii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	xi
BAB I PENDAHULUAN	
I.1 Latar Belakang	I-1
I.2 Rumusan Masalah	I-5
I.3 Batasan Penelitian	I-5
I.4 Tujuan Penelitian	I-5
I.5 Manfaat Penelitian	I-6
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
II.1 Teori Penunjang	II-1
II.1.1 Persebaran <i>Calophyllum inophyllum</i> (Nyamplung) di Indonesia... ..	II-1
II.1.2 Karakteristik Tanaman Nyamplung).....	II-3
II.1.3 Properti dan Kandungan Minyak Nyamplung.....	II-4
II.1.4 Manfaat dan Kandungan dalam Tanaman Nyamplung.....	II-5
II.2 Metode Mendapatkan Ekstrak Minyak Nyamplung	II-7
II.2.1 Ekstraksi.....	II-8
II.2.2 Ekstraksi Fraksi Lemak Non Polar Dari Crude Oil.....	II-11
II.3 Tinjauan Umum Tentang Fatty Acid, Gliserol dan Trigliserida.....	II-12
II.4 Reaksi Hidrolisis Trigliserida	II-17

II.4.1 Reaksi Hidrolisis dengan Bantuan Enzim...	II-18
II.4.2 Enzim Lipase.....	II-19
II.4.2.1 Mikroorganisme Penghasil Enzim Lipase.....	II-20
II.4.3 Whole-Cell Microbial Lipase	II-21
II.4.3.1 Rhizopus oryzae	II-22
II.4.3.2 Lactobacillus plantarum	II-23
II.5 Identifikasi dan karakterisasi	II-24
II.5.1 Metode Kromatografi.....	II-25
II.5.1.1 Uji Menggunakan Thin Layer Chromatography.....	II-25
II.5.1.2 Uji Menggunakan Kolom Kromatografi	II-28
II.5.1.2.1 Pengertian Kolom kromatografi	II-28
II.5.1.2.2 Fase diam.....	II-29
II.5.1.2.3 Membuat kolom (packing)	II-29
II.5.1.2.4 Penyiapan Sampel.....	II-30
II.5.1.2.5 Fase gerak	II-31
II.5.1.2.6 Mendeteksi komponen yang dipisahkan	II-31
II.5.2 Metode Titration	II-32
II.5.2.1 Metode Titration Asidimetri untuk Analisa FFA.....	II-32
II.5.2.2 Metode Titration Oksidimetri Alkalimetri untuk Analisa Triglisierida, Diglisierida, dan Monoglisierida	II-32
II.6 Studi Hasil Penelitian Sebelumnya ...	II-33

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

III.1 Proses Hidrolisis Triglisierida dan Variabel	III-1
III.2 Bahan dan Peralatan	III-1
III.3 Metode Penelitian	III-2

III.3.1 Bahan Penelitian.....	III-2
III.3.2 Prosedur Penelitian.....	III-3
III.3.2.1 Ekstraksi Crude Minyak Nyamplung	III-3
III.3.2.2 Pengembangan Kultur.....	III-4
III.3.2.3 Proses Hidrolisis Trigliserida	III-5
III.3.2.4 Proses Penghentian Hidrolisis....	III-6
III.3.3 Analisa Hasil Hidrolisa	III-6
III.3.3.1 Analisa Jumlah Sel	III-6
III.3.3.2 Analisis Kadar Trigliserida, Digliserida, dan Monoglisgliserida	III-7
III.3.3.2.1 Metode kolom Kromatografi...	III-7
III.3.3.2.2 Tahap Titrasi Oksidi Alkalimetri dan Spektrofotometri... ..	III-8
III.3.3.3 Analisis Kadar FFA (Free Fatty Acid) menggunakan metode asidi Alkalimetri	III-9
III.3.3.4 Analisa Menggunakan TLC... ..	III-9
III.3.4 Skema Penelitian	III-11

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.1 Ekstraksi Liquid-liquid Non Fraksi Lemak Polar (NPLF) dari Crude Minyak Nyamplung.....	IV-2
IV.2 Kurva Pertumbuhan Mikroorganisme	IV-5
IV.2.1 Kurva Pertumbuhan Lactobacillus plantarum... ..	IV-6
IV.2.2 Kurva Pertumbuhan Rhizopus oryzae	IV-7
IV.3 Proses Hidrolisa	IV-8

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan.....	V-1
V.2 Saran.....	V-2

DAFTAR PUSTAKA	xii
DAFTAR NOTASI	xvii
APPENDIKS	
LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

Gambar II.1	Persebaran <i>Calophyllum inophyllum</i> di dunia	II-1
Gambar II.2	Persebaran <i>Calophyllum inophyllum</i> di Indonesia	II-2
Gambar II.3	Bagian-bagian tanaman nyamplung (<i>Calophyllum inophyllum</i>).....	II-3
Gambar II.4	Skema Tahapan Ekstraksi Fraksi NPLF	II-9
Gambar II.5	Sistem <i>Cross-Current</i> Pada Ekstraksi <i>Multiple</i> ...	II-10
Gambar II.6	Trigliserida	II-12
Gambar II.7	Gliserol	II-13
Gambar II.8	Minyak sebagai Bahan Dasar Industri Oleokimia beserta Produk turunannya	II-14
Gambar II.9	Hidrolisis trigliserida	II-15
Gambar II.10	Bentuk <i>Lactobacillus plantarum</i>	II-20
Gambar II.11	Penggambaran skema TLC dengan campuran dua komponen.....	II-22
Gambar II.12	$R_f = Y/X$ (selalu ≤ 1)	II-22
Gambar II.13	Diagram Pemisahan Dua Komponen Pada Kromatografi Kolom	II-26
Gambar III.1	Seperangkat Alat Destilasi	III-2
Gambar III.2	Skema tahapan ekstraksi fraksi PLF.....	III-4
Gambar III.3	<i>Haemocytometer</i> Neubauer	III-7
Gambar IV.1	Layer di Corong Pemisah Stage 1	IV-3
Gambar IV.2	(a) Crude Minyak Nyamplung dan NPLF Hasil Ekstraksi(b) PLF Hasil Ekstraksi dari Stage 1 hingga Stage 8	IV-4
Gambar IV.3	Hasil analisa TLC menggunakan lampu UV. (A) crude minyak nyamplung; (B) fraksi polar; dan (C) fraksi non-polar)	IV-4
Gambar IV.4	Kurva Pertumbuhan <i>Lactobacillus plantarum</i>	IV-6
Gambar IV.5	Kurva Pertumbuhan <i>Rhizopus oryzae</i>	IV-7
Gambar IV.6	Grafik Pengaruh Waktu hidrolisa terhadap Kadar Trigliserida (a), FFA (b), Digliserida (c) dan Monogliserida (d) pada Jumlah Mikroorganisme sebanyak 10^{12} sel/ml mixture.....	IV-9

Gambar IV.7	Grafik Pengaruh Waktu hidrolisa terhadap Kadar Trigliserida (a), FFA (b), Digliserida (c) dan Monogliserida (d) pada Jumlah Mikroorganisme sebanyak 5.10^{12} sel/ml mixture.....	IV-11
Gambar IV.8	Grafik Pengaruh Waktu hidrolisa terhadap Kadar Trigliserida (a), FFA (b), Digliserida (c) dan Monogliserida (d) pada Jumlah Mikroorganisme sebanyak 10^{13} sel/ml mixture.....	IV-13
Gambar IV.9	Grafik Pengaruh Jumlah Mikroorganisme Terhadap (a) Kadar Trigliserida, (b) FFA, (c) Digliserida dan (d) Monogliserida menggunakan <i>R.oryzae</i>	IV-15
Gambar IV.10	Grafik Pengaruh Jumlah Mikroorganisme Terhadap (a) Kadar Trigliserida, (b) FFA, (c) Digliserida dan (d) Monogliserida menggunakan <i>L.plantarum</i>	IV-17
Gambar IV.11	Reaksi Esterifikasi	IV-19

DAFTAR TABEL

Tabel II.1	Karakteristik Tanaman <i>Calophyllum inophyllum</i>	II-4
Tabel II.2	Properti Minyak Nyamplung	II-5
Tabel II.3	Kandungan Lemak dalam Tanaman Nyamplung	II-5
Tabel II.4	Manfaat Tiap Bagian Tanaman Nyamplung	II-6
Tabel II.5	Polaritas <i>Solvent</i>	II-8
Tabel II.6	Kondisi Operasi untuk Berbagai Proses Ekstraksi	II-9
Tabel II.7	Kadar kemurnian crude minyak nyamplung, NPLF dan PLF	II-10
Tabel II.8	Asam Lemak pada Minyak Nyamplung	II-13
Tabel II.9	Sumber Enzim Lipase	II-20
Tabel II.10	Jenis adsorbent.....	II-25

DAFTAR NOTASI

Notasi	Keterangan
DG	<i>Diglyceride</i> , digliserida
FFA	<i>Free fatty acid</i> , asam lemak bebas
g	Gram
MG	<i>Monoglyceride</i> , monogliserida
mg	miligram
mL	mililiter
NPLF	<i>Non polar lipid fraction</i>
PE	<i>Petroleum eter</i>
PLF	<i>Polar lipid fraction</i>
TG	<i>Triglyceride</i> , trigliserida
TLC	<i>Thin layer chromatography</i>
UV	<i>Ultraviolet</i>
UV-VIS	<i>Ultraviolet-Visual</i>

BAB I

PENDAHULUAN

I.1. Latar Belakang

Tanaman mangrove atau yang lebih dikenal dengan sebutan tanaman bakau di Indonesia adalah tanaman yang memiliki banyak kegunaan dan sering dimanfaatkan oleh masyarakat, baik itu mulai dari akar sampai daun dari tumbuhan mangrove sendiri. Tanaman mangrove dapat ditemukan di daerah pesisir Indonesia, dimana 60% total mangrove yang tumbuh di Asia Tenggara tumbuh di wilayah Indonesia dengan sisanya tersebar di Malaysia (11,7%), Myanmar (8,8%), Papua Nugini (8,7%), dan Thailand (5,0%) (Giesen dkk, 2006).

Salah satu jenis tanaman mangrove yang memiliki nilai ekonomis tinggi adalah tanaman nyamplung (*Calophyllum inophyllum L.*), tanaman ini dikatakan memiliki nilai ekonomis tinggi karena hampir semua bagian tanamannya (batang, daun, bunga, biji, dan getah) dapat menghasilkan berbagai macam produk yang dapat dimanfaatkan untuk kepentingan manusia. Hanya saja, sampai saat ini sangat sedikit masyarakat Indonesia yang mengetahuinya. Umumnya, oleh masyarakat Indonesia tanaman nyamplung hanya dikenal sebagai tanaman yang bijinya dapat menghasilkan minyak, dimana minyak dari biji tanaman nyamplung dapat digunakan untuk biodiesel. Padahal, selain bijinya yang dapat digunakan sebagai minyak, seluruh bagian dari tanaman nyamplung dapat dimanfaatkan menjadi barang-barang berguna. Diantaranya, kayu pohon ini dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan papan tempat tinggal bagi manusia maupun kapal dan perabotan lainnya, akarnya berfungsi untuk menjaga daerah pantai dari abrasi. Selain itu, daun tanaman ini juga berfungsi untuk mengobati berbagai macam penyakit seperti iritasi pada mata, migrain, dan vertigo (Ling dkk, 2009).

Selain semua bagian dari tanaman nyamplung dapat dimanfaatkan untuk kebutuhan manusia, tanaman ini juga mempunyai keunggulan, antara lain adalah:

1. Dapat dikembangkan di seluruh pantai Indonesia
2. Budidayanya relatif mudah, yaitu dapat ditanam secara monokultur atau tumpangsari dengan tanaman pertanian dan berbuah sepanjang tahun
3. Mempunyai peran ekologis yang penting, yaitu sebagai tanaman pemecah gelombang, pematah angin, dan konservasi gempa yang terjadi di pantai

Tanaman nyamplung tumbuh secara alami di bagian Afrika Timur, pesisir selatan India ke Malaysia, Australia utara dan Pulau Pasifik. Spesies ini tersebar luas di sepanjang pantai Afrika timur (dari Kenya ke utara Mozambik), Madagaskar dan di beberapa daerah di India. Selain itu juga tersebar di bagian Asia tropis, Australia utara dan pulau-pulau di Samudera Pasifik. Spesies ini banyak ditanam di bagian selatan Cina (Lim, 2012). Penyebaran tanaman nyamplung di Indonesia sendiri meliputi wilayah Sumatera Barat (Taman Nasional (TN) Perbak), Riau, Jambi, Sumatera Selatan, Lampung, Jawa (TN Alas Purwo, TN Kepulauan Seribu, TN Baluran, TN Ujung Kulon, Cagar Alam (CA) Pananjung Pangandaran, Taman Wisata Alam (TWA) Pangandaran, Kawasan Wisata (KW) Batu Karas dan Pantai Carita Banten), Kalimantan Barat, Kalimantan Tengah, Sulawesi, Maluku Utara (Halmahera dan Ternate), Nusa Tenggara Timur, dan Papua (Pulau Yapen, Biak, Nabire, Manokwari, S norong, dan Fakfak). Umumnya tanaman ini terdapat pada daerah pesisir pantai (Supriadi, 2013).

Tanaman nyamplung tumbuh subur di daerah pantai atau di sepanjang daerah dengan ketinggian rendah, sekitar 0-200 meter (660 ft), mencapai 800 meter (2000 ft) di daerah yang dilewati garis ekuator, dengan rata-rata suhu tahunan 18-33°C (64-91°F); serta curah hujan per tahun 1000-5000 mm (40-200 in). tanaman nyamplung dapat tumbuh hingga 9-20 meter (25-65 ft) saat umurnya dewasa, menghasilkan kayu dan minyak dari intinya sebagai produk utama. Produksi biji yang menghasilkan minyak bisa mencapai 100 kg (220 lb) biji/pohon/tahun, dengan *yield* 5 kg (11 lb) minyak (Friday and Okano, 2006).

Tanaman nyamplung mengandung banyak komponen kimia yang mengandung bahan bioaktif yang berkhasiat obat yaitu menghasilkan metabolit sekunder dari golongan *Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor* (NNRTI). NNRTI sendiri merupakan kelompok senyawa yang menghambat aktifitas enzim *reverse transcriptase* dari HIV-1 .

Hemavathy (1990) menyebutkan bahwa minyak nyamplung merupakan bahan baku potensial yang bisa digunakan untuk pembuatan biodiesel. Sedangkan menurut Ling (2009), *C. inophyllum* mengandung senyawa fitokimia yang ditaksir dapat digunakan sebagai obat-obatan untuk berbagai penyakit. Menurut Gunawan dkk.(2015) , *crude oil* minyak nyamplung mengandung 78% trigliserida. Dari *crude oil* tersebut, jika dilakukan pemisahan antara fraksi lipid non polar dan fraksi lipid polar nya didapatkan kandungan trigliserida sebanyak 98,5% dan 44% berturut-turut.

Produksi *fatty acid* melalui proses hidrolisis minyak dan lemak merupakan salah satu hal yang menentukan keekonomisan proses produksi material yang terbarukan. Material yang dapat dihasilkan dari proses ini diantaranya: bahan pelapisan (*coatings*), adhesive, shampo dan sebagainya. Penelitian tentang hidrolisis trigliserida masih berkembang. Hingga saat ini, telah dilakukan penelitian tentang proses hidrolisis dengan *high pressure steam splitting process*, *alkaline hydrolisis process*, dan hidrolisis enzimatik. Pada hidrolisis *high pressure steam splitting process* diperlukan temperatur dan tekanan yang cukup tinggi (250°C, 70 bar) membuat proses ini kurang sesuai untuk pemisahan trigliserida, kemungkinan terjadinya pemanasan berlebih, serta kemungkinan proses hidroksilasi minyak tersebut. Pada hidrolisis alkalin, memerlukan *energy cost* yang cukup tinggi, karena diperlukan proses netralisasi sabun yang terbentuk dan selanjutnya akan dikonversi menjadi asam lemak. Hidrolisis enzimatik trigliserida dapat dilakukan pada kondisi ambient (30-35°C, tekanan atmosferik). Kondisi ini memungkinkan adanya efisiensi energi yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan proses

steam splitting. Enzim yang digunakan pada proses hidrolisis adalah enzim lipase.

Sampai saat ini, telah banyak penelitian yang dilakukan untuk mengetahui cara mekanisme cara kerja enzim lipase pada proses hidrolisis serta esterifikasi dan transesterifikasi pada pembuatan biodiesel. Penggunaan enzim pada suatu reaksi dapat dilakukan dengan meng-imobilisasi enzim secara ekstraselular maupun interselular. Enzim ekstraselular meliputi enzim yang sudah diisolasi dari sumber mikrobiologinya (telah diimobilisasi maupun dalam bentuk bebas). Sedangkan enzim interselular merupakan enzim yang digunakan dengan seluruh komponen sel (*whole-cell*). Kebanyakan, penelitian saat ini masih meneliti cara kerja enzim secara ekstraselular.

Mengacu pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, di dalam minyak nyamplung mengandung trigliserida yang cukup tinggi. Trigliserida ini dapat dihidrolisis untuk menghasilkan asam lemak dengan hasil samping gliserol. Kandungan terbesar asam lemak pada minyak nyamplung adalah asam oleat. Carrasco (2009) menyatakan bahwa oleic acid dalam bentuk garam sodium merupakan salah satu komponen pembuatan sabun sebagai agen pengemulsi dan juga emollient. Oleic acid dalam jumlah sedikit dapat digunakan pada industri farmasi digunakan sebagai agen pengemulsi pada produk aerosol (Smolinske dkk,1992).

Proses hidrolisis sendiri belum ada yang menggunakan *whole cell microbial* sebagai sumber enzim. Oleh karena itu, untuk melengkapi penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, penelitian ini dilakukan lagi dengan tujuan untuk mengetahui bisa atau tidaknya penggunaan *whole-cell* enzim sebagai sumber enzim pada proses hidrolisis trigliserida minyak tanaman nyamplung yang tumbuh di Cilacap, Jawa Tengah.

I.2. Rumusan Masalah

Dari latar belakang yang telah dijabarkan sebelumnya, maka dapat dirumuskan beberapa masalah yang akan dibahas dalam penelitian ini, yaitu:

1. Bagaimana pengaruh jenis mikroorganisme penghasil enzim (*whole-cell*) pada reaksi hidrolisis trigliserida?
2. Bagaimana pengaruh jumlah mikorganisme penghasil enzim (*whole-cell*) pada reaksi hidrolisis trigliserida?
3. Bagaimana pengaruh waktu pada reaksi hidrolisis trigliserida?

I.3. Batasan Penelitian

Agar penelitian ini tidak menyimpang dari ketentuan yang digariskan, maka diambil batasan dan asumsi sebagai berikut:

1. Bagian yang akan diteliti adalah minyak nyamplung yang berasal dari inti di dalam biji tanaman nyamplung. Minyak nyamplung yang digunakan berasal dari Cilacap, Jawa Tengah.
2. Ekstrak minyak dipisahkan dari senyawa polar dan non-polarnya menggunakan *Multi Stage Extraction*.
3. Mikroorganisme yang digunakan adalah *Rhizopus oryzae* dan bakteri *L.Plantharum*
4. Senyawa yang terkandung di dalam NPLF minyak nyamplung, *fatty acid* (hasil reaksi hidrolisis) akan diidentifikasi secara kualitatif menggunakan TLC (*Thin Layer Chromatography*), kolom kromatografi dan secara kuantitatif menggunakan analisa titrasi asidialkalimetri serta oksidialkalimetri.

I.4. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari dilakukannya penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh jenis mikroorganisme penghasil enzim (*whole-cell*) pada reaksi hidrolisis trigliserida

2. Mengetahui pengaruh jumlah mikorganisme penghasil enzim (*whole-cell*) pada reaksi hidrolisis trigliserida.
3. Mengetahui pengaruh waktu pada reaksi hidrolisis trigliserida

I.5. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari dilakukannya penelitian ini adalah:

1. Dapat mengetahui senyawa yang terkandung di dalam fraksi non polar minyak nyamplung.
2. Dapat mengetahui penggunaan mikroorganisme sebagai sumber enzim pada reaksi hidrolisis trigliserida.
3. Dapat mengedukasi masyarakat mengenai manfaat-manfaat tanaman nyamplung selain minyaknya yang biasanya digunakan sebagai bahan baku biodiesel.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Teori Penunjang

II.1.1 Persebaran *Calophyllum inophyllum* (Nyamplung) di Indonesia.

Nama ilmiah dari *Calophyllum inophyllum* diambil dari bahasa Yunani *Kalos*, yang berarti cantik dan *Phyllon* yang berarti daun. Di Inggris, pohonnya dikenal sebagai *beautiful leaf* (terjemahan dari bahasa Yunani), *Indian Laurel* (karena berasal dari India), *Alexandrian Laurel*, dan *Beach Calophyllum* (karena pohonnya biasanya tumbuh di tepi pantai). Di Tahiti, pohon ini dinamakan *ati* dan buahnya disebut *tamanu*. Di Samoa, pohon ini dikenal dengan nama *fetau*, *damanu* di Pulau Fiji, dan *te itai* di Pulau Kiribati. Sedangkan di Indonesia, tanaman ini disebut dengan *Nyamplung*, *Penaga Laut* di Malaysia, dan *Puna* di Pulau Lakshadweep. Sedangkan di Hawaii tanaman ini dinamakan *Kamani Tree* dan dikenal dengan sebutan *Foraha Tree* di Madagascar (Ling dkk, 2009).



Gambar II.1 Persebaran *Calophyllum inophyllum* di dunia

Peta persebaran nyamplung atau *Calophyllum inophyllum* di dunia dapat dilihat pada **Gambar II.1**. Spesies ini umumnya ditemukan di daerah yang memiliki iklim tropis. Di dunia, spesies

ini terdapat di negara-negara seperti Australia, Cambodia, Pulau Cook, Fiji, French Polynesia, India, Indonesia, Jepang, Kiribati, Laos, Madagaskar, Malaysia, Marshall Islands, Myanmar, New Caledonia, Pulau Norfolk, Papua Nugini, Filipina, Reunion, Samoa, Pulau Solomon, Sri Lanka, Taiwan, Provinsi China, Thailand, Tonga, Vanuatu, dan Vietnam. Sedangkan untuk spesies yang exotic (endemik pada suatu wilayah) dapat ditemukan di Negara Djibouti, Eritrea, Ethiopia, Kenya, Nigeria, Somalia, Tanzania, Uganda, dan Amerika Serikat.

Di Indonesia sendiri, tanaman *Calophyllum inophyllum* atau yang biasa disebut tanaman nyamplung tersebar hampir merata di seluruh wilayah Indonesia. Pada **Gambar II.2**, dapat diketahui bahwa wilayah persebaran tanaman ini mencakup Pulau Sumatera (Sumatera Barat, Riau, Kepulauan Riau, Lampung, dan Kepulauan Bangka Belitung), Pulau Jawa (Banten, Jawa Barat, Jawa Tengah Jogjakarta, Jawa Timur), Pulau Bali, Pulau Nusa Tenggara Timur dan Nusa Tenggara Barat, Pulau Kalimantan (Kalimantan Barat, Kalimantan Tengah, dan Kalimantan Selatan), Pulau Sulawesi (Sulawesi Utara, Gorontalo, Sulawesi Tengah, Sulawesi Selatan, dan Sulawesi Tenggara), Maluku dan Kepulauan Maluku Utara, dan Papua (Sudrajat, 2009).



Gambar II.2 Persebaran *Calophyllum inophyllum* di Indonesia

II.1.2 Karakteristik Tanaman Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*)

Tanaman *Calophyllum inophyllum* memiliki berbagai macam nama sebutan yang berbeda-beda di setiap wilayah. Di Indonesia kebanyakan menyebut tanaman ini dengan nama Nyamplung. Di Inggris, warga setempat menyebutnya dengan Tamanu. Di Hawaii orang sekita menyebutnya dengan Kamani, dan masih banyak lagi sebutan yang lain (Dweck and Meadows, 2002). Tanaman *Calophyllum inophyllum* atau yang biasa disebut Nyamplung memiliki taksonomi sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae (tumbuhan)
Subkingdom	: Tracheobionta (berpembuluh)
Superdivisio	: Spermatophyta (Menghasilkan Biji)
Divisio	: Magnoliophyta (berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida (berkeping dua/dikotil)
Sub-Kelas	: Dilleniidae
Ordo	: Theales
Familia	: Clusiaceae

(Heyne dkk, 1987)



Gambar II.3 Bagian-bagian tanaman nyamplung (*Calophyllum inophyllum*)

Morfologi dari tanaman nyamplung dapat dilihat pada **Gambar II.3**. Nyamplung adalah tanaman yang mudah tumbuh di daerah yang bertanah pasir dan daerah pesisir pantai berudara

panas (Wahyun dkk, 2010). Nyamplung juga dapat tumbuh baik pada ketinggian 0-800 mdpl seperti di hutan, pegunungan, dan rawa-rawa (Baity dkk, 2011). Karakteristik tumbuhan nyamplung dapat dilihat di **Tabel II.1** berikut ini :

Tabel II.1 Karakteristik tanaman *Calophyllum inophyllum*

Nama Tanaman	Bagian	Ciri-ciri
Batang		Berkayu, bulat, dan berwarna coklat atau putih kotor.
Daun		Berwarna hijau, tunggal, bersilang berhadapan, bulat memanjang atau bulat telur, ujung tumpul, pangkal membulat, tepi rata, pertulangan bersirip, panjang 10-21 cm, tangkai 1,5-2,5 cm, daging daun seperti kulit/belulang.
Bunga		Majemuk, bentuk tandan, di ketiak daun yang teratas, berkelamin dua, diameter 2-3 cm, daun berkelopak empat, tidak beraturan, benang sari banyak, tangkai putih membengkok, kepala putik bentuk perisai, daun mahkota empat, bentuk perisai.
Buah		Batu, bulat seperti peluru dengan mancung kecil di depannya, diameter 2,3-3,5 cm, berwarna coklat.
Akar		Tunggang, bulat, berwarna coklat.

*Yunitasari dkk, 2008

II.1.3 Properti dan Kandungan Minyak Nyamplung

Tanaman nyamplung dapat tumbuh hingga 20-30 meter. Ketika dewasa, satu buah pohon dapat menghasilkan hingga 100 kg buah, dan memproduksi sekitar 18 kg minyak. Inti buah nyamplung mengandung minyak dengan jumlah yang cukup

tinggi, yaitu sekitar 75% berat (Venkanna, 2009). Jumlah ini tidak jauh berbeda dengan apa yang diutarakan Hemavathy and Prabhakar (1990) yaitu sebesar 60,1%.

Dari penelitian yang dilakukan oleh Venkanna (2009) tentang properti minyak nyamplung, didapatkan hasil yang dijabarkan pada **Tabel II.2** berikut ini:

Tabel II.2 Properti minyak nyamplung

Properti	Nilai
<i>Density</i> , kg/m ³	910,0
K. V., at 400°C	32,48
<i>Flash point</i> , °C	224
<i>Saponification value</i>	191 – 202
<i>Iodine value</i>	82 – 98
<i>Acid value</i> mg KOH/g	4,76

Triacylglycerol (TAG) adalah kandungan yang dominan di dalam minyak, yaitu sebesar 76,7%, diikuti oleh *Free Fatty Acid* (FFA) sebesar 7,0%, dan yang terakhir *Diacylglycerol* (DAG) sebesar 5,1%. Sisa dari % beratnya adalah milik *Monoacylglycerol* (MAG) di mana, hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh hidrolisis TAG selama masa penyimpanan (Crane dkk, 2005). Berikut ini pada **Tabel II.3** diberikan kadar kemurnian tiap komponen di dalam minyak nyamplung dari beberapa sumber.

Tabel II.3 Kandungan lemak dalam tanaman nyamplung

Jenis Lemak	Kadar ^a (%)	Kadar ^b (%)	Kadar ^c (%)
<i>Free Fatty Acid (FFA)</i>	5,1	7,4	8,51
<i>Monoacylglycerol (MAG)</i>	<0,1	1,8	2,75
<i>Diacylglycerol (DAG)</i>	7	5	5,35
<i>Triacylglycerol (TAG)</i>	76,7	82,3	78
<i>Sterols, Sterolesters, and hydrocarbon</i>	-	3,5	2,47
<i>Others</i>	11,2	-	2,63

^a Crane dkk., 2005

^b Hermavathy dan Prabhakar, 1990

^c Gunawan dkk., 2015

II.1.4 Manfaat dan Kandungan dalam Tanaman Nyamplung (*Calophyllum inophyllum*)

Calophyllum Inophyllum (Nyamplung) merupakan tanaman serba guna, mulai dari manfaat pohonnya sebagai tanaman konservasi dan penghijauan sampai pada produk yang dihasilkan yaitu kayu dan hasil hutan bukan kayu (HHBK) berupa biji yang dimanfaatkan sebagai penghasil minyak nabati (Hemavathy dan Prabhakar, 1990).

Di dunia farmasi, tanaman ini dikenal dapat berfungsi sebagai anti bakteri, anti kankerantineoplastic, anti inflamasi, antiplatelet, antipsikotik, antiviral, Photoprotective, Molluscicidal, dan Piscicidal (Ling dkk, 2009). Beberapa manfaat tanaman nyamplung dapat dilihat pada **Tabel II.4** yang telah diolah dari berbagai sumber :

Tabel II.4 Manfaat Tiap Bagian Tanaman Nyamplung

Nama Bagian Tanaman	Ciri-ciri
Getah	Penduduk Samoa menggunakan getah tanaman ini dengan mengoleskannya di ujung panah mereka untuk berburu. Getah ini menyebabkan kebutaan jika terjadi kontak dengan mata, dan akan menyebabkan kematian apabila terbawa ke sirkulasi darah.
Akar	Di Mauritius rebusan akar tanaman ini digunakan untuk mengobati bisul dan <i>ophthalmia</i> (mata bengkak).
Kulit Pohon	Kulit pohon dapat digunakan sebagai obat analgesic, anti-plasmodic, dan mengandung tannin. Di India dan Indo-China, kulit pohon yang ditumbuk

	digunakan dalam orchitis. Di Indo-China, kulit pohon digunakan untuk mengobati disentri. Sementara di Indonesia, rebusan kulit pohon digunakan setelah melahirkan sebagai pembersih alat kelamin dan pada penyakit gonorrhea.
Daun	Rebusan daun hangat digunakan untuk luka toreh, luka lecet, jerawat, dan beberapa penyakit kulit ringan lain akibat bakteri. Di Madagaskar, Linga, dan Fiji, air rebusan ini juga digunakan untuk mengobati mata bengkak.

*) Sumber: Lim dkk, 2012

II.2 Metode Mendapatkan Ekstrak NPLF dan PLF Minyak Nyamplung


Senyawa polar adalah suatu senyawa yang terbentuk akibat satu atom mempunyai keelektronegatifan yang substansial lebih besar daripada yang lain. Semakin elektronegatif suatu atom, semakin besar tarikannya terhadap ikatan elektron. Hasilnya adalah suatu ikatan dengan distribusi rapat elektron yang tak merata. Senyawa non-polar adalah suatu senyawa yang terbentuk akibat atom dengan keelektronegatifan yang sama atau hampir sama membentuk ikatan kovalen, dimana kedua atom menerapkan tarikan yang sama atau hampir sama terhadap elektron ikatan. Umumnya, ikatan karbon-karbon dan ikatan karbon-hidrogen adalah jenis ikatan nonpolar yang paling umum (Fessenden, R.J., 1986)

Untuk mengidentifikasi kandungan senyawa polar dan non-polar dari minyak tanaman nyamplung, hal yang perlu dilakukan pertama kali adalah memisahkan antara kandungan polar dan non-polarnya. Pemisahan ini berdasarkan pada *solvent* yang digunakan.

Pemilihan *solvent* tersebut berdasarkan *polarity index*. Air merupakan *solvent* polar dengan *polarity index* sebesar 9.

Sedangkan metanol merupakan senyawa agak polar dengan *polarity index* sebesar 5,1. Untuk n-heksana/*petroleum eter* merupakan senyawa non-polar dengan *polarity index* sebesar 0 (Sadek, 2002). Dengan dua sifat polaritas yang berbeda diharapkan senyawa polar yang terkandung dalam daun nyamplung akan terlarut pada *solvent* polar begitu pun sebaliknya. Polar atau non-polar suatu senyawa dapat dilihat pada **Tabel II.5** berikut ini:

Tabel II.5 Polaritas *solvent* (Sadek, P. 2002)

Relative Polarity	Formula	Group	Solvents
<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg); font-weight: bold; margin-right: 10px;">Non-polar</div> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg); font-weight: bold; margin-left: 10px;">Polar</div> </div>	R-H	Alkanes	Petroleum ethers, hexanes, ligroin
	Ar-H	Aromatics	Toluene
	R-O-R	Ethers	Diethyl ether
	R-X	Alkyl halides	Trichloromethane, chloroform
	R-COOR	Esters	Ethyl acetate
	R-CO-R	Aldehydes, Ketones	Acetone, MEK
	R-NH ₂	Amines	Phyridine, triethylamine
	R-OH	Alcohols	MeOH, EtOH, IPA, Butanol
	R-COHN ₂	Amides	Dimethylformamide
	R-COOH	Carboxylic Acid	Ethanoic acid
	H-O-H	Water	

II.2.1 Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan suatu zat atau beberapa dari suatu padatan atau cairan dengan bantuan pelarut. Pelarut di sini, tidak atau hanya sebagian larut dengan padatan atau cairan dengan kontak secara terus-menerus agen aktif berpindah dari campuran padatan/cairan (*raffinate*) menuju

pelarut (*extract*). Setelah pencampuran dua fase, proses pemisahan dilakukan dengan prinsip gravitasi atau dengan gaya sentrifugal .

Pada percobaan yang dilakukan oleh Hargono dan Haryani (2010), dijelaskan tentang pengaruh jenis *solvent* pada berbagai variasi *tray* dari jumlah 6 – 10 buah untuk pengambilan minyak nyamplung dengan metode ekstraksi kolom dengan *solvent* yang digunakan adalah *n-hexane* dan *n-petroleum*. Dari hasil penelitiannya, penulis menjelaskan bahwa *solvent n-hexane* lebih baik daripada *solvent n-petroleum*. Hal ini dikarenakan pada penggunaan *n-petroleum* jumlah minyak sudah mencapai kondisi maksimum atau suatu kondisi di mana minyak yang terekstrak sudah mencapai titik optimum yaitu pada *tray* 7, sehingga pada *tray* 8, 9, dan 10 hasil minyak yang didapat menjadi lebih sedikit dan cenderung menurun. Lain halnya pada *solvent n-hexane* yaitu minyak yang diperoleh terus meningkat di setiap kenaikan *tray*, dan ini akan lebih bermanfaat pada ekstraksi dengan penggunaan *tray* yang lebih banyak. Dari beberapa penelitian terdahulu, terdapat berbagai kondisi operasi untuk beberapa proses ekstraksi, selengkapnya dapat dilihat pada **Tabel II.6** berikut ini;

Tabel II.6 Kondisi Operasi untuk Berbagai Proses Ekstraksi

Parameter	<i>Modified Soxhlet Extraction</i>	Ekstraksi Soxhlet	Maserasi	<i>Pressurized Lipid Extraction</i>
Pelarut Umum yang Digunakan	Heksana, Ethyl acetate	Methanol, ethanol, atau campuran etanol dan air	Methanol, ethanol, atau campuran etanol dan air	CO ₂ , Alkohol, Dichloromethane-acetone
Temperatur (°C)	Dipanaskan	Tergantung pelarut yang digunakan	Dapat dipanaskan	Dipanaskan
Penggunaan	Tidak bisa	Tidak bisa	Tidak bisa	Bisa

Tekanan diatas 1 atm				(50-250 bar)
Waktu yang Dibutuhkan	11-12 jam	3 – 18 jam	3-4 hari	5 menit
Volume Pelarut yang Dibutuhkan (ml)	350	150 – 200	Tergantung banyaknya sampel	Dapat mengurangi penggunaan pelarut 30 mL/sampel dibandingkan dengan ekstraksi soxhlet
Referensi	Fabian dkk,2009; Gunawan dkk,2008; Kasim dkk,2009; Gunawan dkk,2013	Hargono dan Haryani, 2010.	Sasidharan dkk, 2011.	Saleh, N.M. dkk, 2009

Tabel II.7 Kadar kemurnian crude minyak nyamplung, NPLF dan PLF

Komponen	Crude minyak nyamplung	NPLF	PLF
<i>Free Fatty Acid (FFA)</i>	8,51 %	0,35 %	20,9 %
<i>Monoacylglycerol (MAG)</i>	2,75 %	0,06 %	6,8 %
<i>Diacylglycerol (DAG)</i>	5,35 %	0,42 %	13,2 %
<i>Triacylglycerol (TAG)</i>	78 %	98,5 %	44 %
<i>Wax</i>	2,47 %	-	-
<i>Others</i>	2,63 %	0,64 %	14,8 %

(Aparamarta dkk, 2015)

Dari **Tabel II.7** dapat diketahui kandungan *crude* minyak nyamplung, fraksi non polar dan fraksi polarnya. Fraksi non polar minyak nyamplung mengandung trigliserida 98,5%.

II.4.2 Enzim Lipase

Lipase termasuk salah satu kelompok hidrolase, dengan subkelas estrase dan nama sistematik triasilgliserol asil hidrolase (EC 3.1.1.3). Lipase cenderung bersifat polar, sedangkan substratnya-triasilgliserol merupakan senyawa nonpolar, sehingga lipase bekerja pada bagian antar muka (*interface*) fasa air dan fasa minyak. Secara umum, struktur lipase merupakan lipatan rantai polipeptida yang menghalangi sisi katalitik, dengan terowongan hidrofobik yang dapat mengakomodasi rantai asam lemak, sehingga memungkinkan pergerakan substrat untuk berinteraksi dengan sisi katalitik.

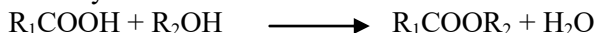
Lipase mampu mengkatalisis berbagai reaksi diantaranya reaksi hidrolisis, estereifikasi, transesterifikasi (asidolisis, interestifikasi, serta alkoholisis), dan aminolisis (Ozturk,2001).

Dalam medium air, lipase akan bertindak sebagai enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis. Namun dalam medium pelarut organik, lipase cenderung bekerja dalam reaksi esterifikasi dan transesterifikasi daripada reaksi hidrolisis (Adamopoulos,2006). Berbagai reaksi yang dikatalisis oleh lipase (Ozturk,2001):

a. Hidrolisis



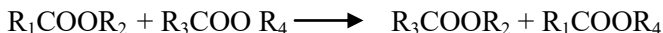
b. Ester Synthesis



c. Asidolisis



d. Interesterifikasi



e. Alkoholisis



f. Aminolisis



II.4.2.1 Mikroorganisme Penghasil Enzim Lipase

Lipase merupakan enzim yang memiliki peran yang penting dalam bioteknologi modern. Banyak industri yang telah mengaplikasikan penggunaan enzim sebagai biokatalis. Lipase terkenal memiliki aktivitas yang tinggi dalam reaksi hidrolisis dan dalam kimia sintesis. Lipase dapat berperan sebagai biokatalis untuk reaksi reaksi hidrolisis, esterifikasi, alkoholisis, asidolisis and aminolisis. *Candida* dan *Rhizopus* yang merupakan organisme yang paling sering dipakai sebagai sumber sintesis penghasil lipase (Pandey dkk, 1999).

Yucel (2013) menerangkan bahwa penggunaan lipase untuk skala komersial masih agak terbatas karena salasan ekonomis dimana lipase memiliki harga yang mahal. Pada tahun 2010, Sigma Aldrich memasarkan enzim lipase imobilisasi menggunakan imobead 150 dari jamur *Rhizomucor miehei* dengan harga 2,7 juta rupiah per 10 gram.

Lipase dari mikroorganisme memiliki spektrum yang lebih luas untuk diaplikasikan di industri karena lebih stabil dan lebih murah. Enzim lipase yang dapat berasal dari sekresi mikroba *Rhizopus oryzae*, yaitu lipase yang bereaksi secara spesifik memutus rantai *fatty acid* trigliserol pada posisi sn-1 dan sn- 3, sering disebut dengan lipase spesifik regio 1,3. Enzim lipase dapat diperoleh/diisolasi dari tumbuhan (*papaya latex, oat seed lipas*), binatang (babi, enzim dari pankreas manusia), bakteri, fungi, dan *yeast*. (Yucel ,2013). Beberapa mikroorganisme penghasil enzim lipase dapat dilihat pada **Tabel II.9** berikut ini:

Tabel II.9 Sumber Enzim Lipase

Mikroorganisme Penghasil Lipase	Litelatur
<i>Aspergillus niger</i>	Namboodiri dkk (2000)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Toida J dkk (1998)
<i>Escherichia coli</i>	Bei Gao dkk.(2009)
<i>Rhizopus sp</i>	Macedo GA dkk. (2003)

<i>Rhizopus oryzae</i>	Arai S dkk (2010) Matsumoto dkk(2001)
<i>Bacillus sp.</i>	Bell dkk(2002),Kambourova dkk (1996)
<i>Bacillus subtilis</i>	Ruiz C dkk (2005) Eggert T, dkk(2003)
<i>Bacillus thermoleovorans</i>	Rua ML, dkk (1997)
<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	Lee DW dkk (1999)
<i>Pseudomonas sp.</i>	Sarkar S dkk (1998)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Kojima Y dkk(1994)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Herrgard S dkk. (2000)
<i>Geotrichum candidum</i>	Jacobsen T, dkk(1995) Sidebottom (1991)
<i>Pichia burtonii</i>	Sugihara dkk (1995)
<i>Pseudomonas fragi</i>	Nishio T dkk (1987)
<i>LactoBacillus plantarum</i>	Nambodiri VM (2000)

II.4.3 Whole-Cell Microbial Lipase

Harga lipase komersial biasanya sangat tinggi karena proses produksinya yang sulit dan memakan waktu. Selain itu, dalam proses reaksi enzimatik, lipase tidak dapat digunakan kembali lagi karena terlarut dalam media reaksi (Kirk dkk. , 2002).

Hal ini menyebabkan biaya reaksi yang dikatalisis lipase menjadi meningkat. Perlu adanya penelitian tentang teknik penggunaan kembali lipase, salah satunya adalah teknik penggunaan mikroorganisme secara keseluruhan sebagai sumber enzim lipase. Penggunaan sel mikroorganisme seperti fungi, bakteri, dan sel yeast yang mengandung lipase intraseluler merupakan cara yang lebih mudah dari pada penggunaan lipase ekstraseluler. Jika dibandingkan dengan proses enzimatik konvensional, penggunaan *whole-cell* menghasilkan proses pengoperasian yang stabil. Penggunaan *whole-cell* juga tidak perlu melakukan prosedur isolasi, pemurnian, dan imobilisasi enzim yang rumit (Fukuda dkk, 2008)

Aspergillus dan *Rhizopus* merupakan mikrobiologi yang banyak diteliti dan digunakan sebagai biokatalis *whole-cell*. Ban dkk (2001) menggunakan *Rhizopus oryzae* yang diimobilisasi dalam pembuatan biodiesel.

II.4.3.1 *Rhizopus oryzae*

Dalam klasifikasi *Rhizopus oryzae* masuk kedalam familia *mucoraceae* yang termasuk dalam kelompok kapang. *Rhizopus oryzae* mempunyai ciri-ciri yaitu merupakan Koloni berwarna putih yang berangsur-angsur menjadi abu-abu, Sporangiofora tumbuh dari stolon dan mengarah ke udara, baik tunggal atau dalam kelompok (hingga 5 sporangiofora), Rhizoid pada *Rhizopus oryzae* tumbuh berlawanan dan terletak pada posisi yang sama dengan sporangiofora, sporangia globus atau sub globus dengan dinding berspinulosa (duri-duri pendek), yang berwarna coklat gelap sampai hitam bila telah masak, Kolumela oval hingga bulat, dengan dinding halus atau sedikit kasar, Sporangya berbentuk bulat, oval atau berbentuk elips atau silinder. Suhu optimal untuk pertumbuhan 35⁰C, minimal 5-7⁰C dan maksimal 44⁰C. Berdasarkan asam laktat yang dihasilkan *Rhizopus oryzae* termasuk mikroba heterofermentatif

Klasifikasi *Lactobacillus plantarum* antara lain :

Kingdom	: Fungi
Phylum	: Zygomycota
Class	: Zygomycetes
Ordo	: Mucorales
Familia	: Mucoraceae
Genus	: <i>Rhizopus</i>
Species	: <i>Rhizopus oryzae</i>

Penggunaan *Rhizopus oryzae* sebagai sumber *whole-cell*, didasari oleh beberapa alasan, yakni:

- R.oryzae* mudah didapatkan dan dapat digunakan tanpa melalui rekayasa genetik (Koda,2010)
- R.oryzae* merupakan penghasil enzim lipase yang bersifat intraselular, yakni lipase berada di dalam sel atau di

dalam dinding sel. Enzim jenis ini lebih ekonomis jika dibandingkan dengan enzim yang bersifat ekstraseluler (Fukuda,2008).

- c) *R.oryzae* merupakan salah satu jenis fungi penghasil jamur yang banyak diteliti sebagai penghasil enzim lipase.

Enzim Lipase yang dihasilkan oleh *R.oryzae* dari proses fermentasi tidak menunjukkan adanya racun dan tidak berpotensi sebagai mutagen (Coenen dkk, 1997). Hasil penelitian Flood dan Mitsuru (2003), menunjukkan bahwa Lipase D yang menghidrolisa triasilgliserol menjadi asam lemak aman digunakan untuk fermentasi dalam industri pangan.

II.4.3.2 *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus adalah genus bakteri gram-positif, anaerobik fakultatif atau mikroaerofilik. Genus bakteri ini membentuk sebagian besar dari kelompok bakteri asam laktat, dinamakan demikian karena kebanyakan anggotanya dapat mengubah laktosa dan gula lainnya menjadi asam laktat. Kebanyakan dari bakteri ini umum dan tidak berbahaya bagi kesehatan. Beberapa spesies *Lactobacillus* sering digunakan untuk industri pembuatan yogurt, keju, sauerkraut, acar, bir, anggur (minuman), cuka, kimchi, cokelat, dan makanan hasil fermentasi lainnya, termasuk juga pakan hewan, seperti silase. Bakteri ini bekerja secara metabolisme homofermentatif (hanya membentuk asam laktat dari gula).

Klasifikasi *Lactobacillus plantarum* antara lain :


Kingdom	: Bakteri
Phylum	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Ordo	: Lactobacillales
Family	: Lactobacillaceae
Genus	: Lactobacillus
Spesies	: Lactobacillus plantarum

II.5.1 Metode Kromatografi

II.5.1.1 Uji Menggunakan *Thin Layer Chromatography*

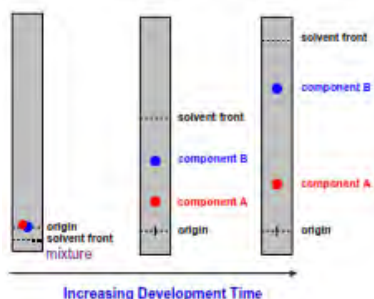
Thin Layer Chromatography (TLC) merupakan metode yang banyak digunakan untuk pemisahan dan identifikasi suatu senyawa di dalam suatu campuran. TLC menggunakan prinsip yang sama dengan ekstraksi untuk mencapai pemisahan dan pemurnian senyawa, yaitu pemisahan yang berbeda dari senyawa antara dua fase berdasarkan perbedaan kelarutan senyawa dalam dua tahap. Dalam metode TLC, satu fase adalah fase gerak dan fase lainnya adalah fase diam dengan luas permukaan yang tinggi. Fase diam biasanya terdiri dari adsorben halus, contohnya silica (SiO_2), atau alumina (Al_2O_3) yang digunakan dalam bentuk lapisan tipis (sekitar 0,25 mm). Fase gerak terdiri dari pelarut organik yang mudah menguap.

Tabel II.10 Jenis *adsorbent*

	<i>Adsorbent</i>
<i>Most Strongly Adsorbent</i>	Silika Gel
	Charcoal
	Alumunium Oksida
	Magnesium Karbonat
	Kalsium Phospat
<i>Least Strongly Adsorbent</i>	Selulosa

TLC terdiri atas tiga langkah yaitu *spotting*, *development*, dan *visualization*. Pada *spotting*, sampel akan ditotolkan pada plate TLC dalam jumlah yang kecil dengan menggunakan *micropipet*. Pada *development*, senyawa-senyawa dalam sampel akan terelusi dengan kecepatan yang tergantung pada sifat senyawa-senyawa tersebut (kemampuan terikan pada fasa diam dan kemampuan larut dalam fasa gerak). Senyawa non-polar akan lebih sedikit tertarik pada *plate* sehingga akan menghabiskan waktu yang lebih banyak pada fase gerak. Senyawa ini akan bergerak lebih cepat dan muncul lebih dekat dengan puncak dari plate. Sedangkan senyawa polar akan lebih

tertarik pada *plate* sehingga akan menghabiskan waktu lebih sedikit pada fase gerak dan akan muncul lebih rendah pada *plate*. Pada visualisasi, *spot-spot* dapat secara langsung diamati setelah proses *development*. Namun karena pada umumnya suatu senyawa tidak berwarna, metode visualisasi dibutuhkan. Misalnya pada silika gel dalam *plate* TLC yang akan menampilkan dark spot dibawah sinar ultraviolet atau dengan menempatkan *plate* pada iodin *vapor* dalam beberapa menit. Senyawa-senyawa organik pada umumnya akan membentuk warna gelap kompleks dengan iodin.

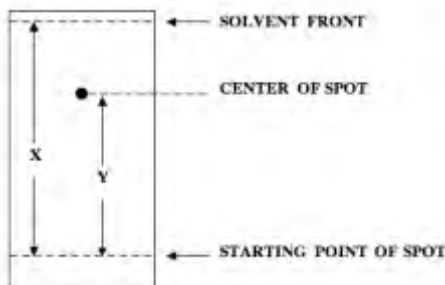


Gambar II.11 Penggambaran skema TLC dengan campuran dua komponen

Pada Gambar II.11 dapat dilihat bahwa semakin berjalannya waktu, komponen A dan komponen B akan terpisah. *Solvent* terus bergerak menuju atas dengan prinsip kapilaritas. Komponen B merupakan senyawa yang kurang polar dibandingkan komponen A karena lebih dekat dengan puncak *plate*. Sedangkan komponen A merupakan senyawa yang lebih polar.

Analisis suatu senyawa dalam TLC biasanya dilakukan dengan dibandingkan terhadap senyawa standarnya. Nilai R_f (*Retardation factor*) digunakan untuk mengkuantitaskan perpindahan dari suatu material sepanjang *plate*. R_f sebanding dengan jarak yang berpindah dari suatu substansi dibagi dengan jarak yang berpindah dari suatu *solvent*. Biasanya nilainya diantara nol dan satu. Umumnya efektif *solvent* memiliki nilai R_f

antara 0,3-0,7. Secara ideal, nilai R_f akan sama dari senyawa yang diberikan dengan menggunakan pelarut yang sama. Secara praktis, perpindahan berdasarkan dari struktur dan ketebalan dari *layer*, jumlah air tersisa, dan efek dari *binding agents*.



Gambar II.12 $R_f = Y/X$ (selalu ≤ 1)

Thin Layer Chromatography (TLC) ini adalah analisa kualitatif. Keuntungan dengan menggunakan metode TLC adalah mudah, cepat, dan murah. Namun terkadang juga ada masalah dengan metode ini, misalnya adalah sampel tidak muncul yang kemungkinan dapat disebabkan karena sampel tidak cukup atau dibutuhkan metode visualisasi yang berbeda (<https://www.chem.wisc.edu>).

Dari penelitian yang dilakukan Yimdjoko (2004) metode TLC digunakan untuk mengisolasi senyawa *anti-microbial* di dalam minyak tanaman nyamplung. Kandungan ini kemudian digunakan untuk uji toksisitas melawan *human epidermoid carcinoma* pada sel *nasopharynx* (KB). Ekstrak minyak seberat 200 gram dimasukkan ke atas silika gel, lalu dielusi oleh campuran *n-hexane* dan *ethyl acetate*. Total didapatkan 117 fraksi yang kemudian dibagi menjadi 6 kelompok.

Anna Iskandari (2010), TLC digunakan untuk menentukan tiap langkah yang dilakukan pada proses kromatografi untuk isolasi senyawa bahan seperti pemilihan sistem eluen dan monitoring jumlah komponen yang ada dalam suatu fraksi. TLC juga digunakan untuk memonitoring kemurnian dari suatu senyawa. Senyawa tunggal tersebut dimonitoring

dengan uji TLC menggunakan variasi eluen, jika spot dari beberapa elusi tetap satu, maka senyawa diduga murni. Pada penelitian ini digunakan plat silika yang spesifik untuk senyawa aromatik yaitu plat silika GF₂₅₄. Reagen penyemprot yang digunakan adalah reagen umum untuk mendeteksi adanya senyawa aromatik, yaitu Ce(SO₄)₂. Senyawa yang diduga murni ini dielusidasi dengan spektrofometri IR, UV, H NMR, C NMR, C NMR DEPT 90 dan NMR dua dimensi.

II.5.1.2 Uji Menggunakan Kolom Kromatografi

Kromatografi kolom termasuk kromatografi cairan, adalah metoda pemisahan yang cukup baik untuk sampel lebih dari 1 gram. Pada kromatografi ini sampel sebagai lapisan terpisah diletakkan diatas fase diam. Sampel dihomogenkan dengan fase diam sehingga merupakan serbuk kering, diatas lapisan ini dapat diletakkan pasir untuk menjaga tidak terjadinya kerusakan waktu ditambahkan fase gerak diatas lapisan sampel. Fase diam dan sampel ini berada di dalam kolom yang biasanya dibuat dari gelas, logam ataupun plastik. Selama elusi fase gerak dialirkan dari atas, mengalir karena gaya gravitasi atau ditekan dan juga disedot dari arah bawa. Komponen sampel akan terpisah selama bergerak dibawa fase gerak didalam kolom (fase diam). Komponen yang paling tidak tertahan oleh fase diam akan keluar lebih dahulu dan diikuti oleh komponen lain. Semuanya ditampung sebagai fraksi, volume tiap fraksi tergantung besarnya sampel (kolom).

II.5.1.2.1 Pengertian Kolom kromatografi

Kolom biasanya berbentuk seperti buret untuk titrasi, ukurannya beragam. Perbandingan panjang kolom sekurang-kurangnya 10 kalinya diameternya, perbandingan ini tergantung mudah tidaknya komponen dipisahkan. Perbandingan berat sampel dan fase gerak (1 : 30) biasanya cukup memadai untuk pemisahan yang mudah, perbandingan dapat ditingkatkan hingga (1:50) untuk komponen yang susah dipisahkan.

II.5.1.2.2 Fase diam

Ukuran partikel fase diam biasanya lebih besar dari ukuran partikel fase diam untuk KLT, ukuran yang digunakan antara 63-250 μ m. Ukuran partikel lebih kecil 63 μ m fase gerak akan mengalir lebih lambat, sehingga perlu ditekan atau dihubungkan dengan pipa hisap. Silika gel (SiO_2) adalah fase diam yang serba guna, banyak digunakan. Pada pembuatannya silika gel perlu diaktifkan panaskan pada 150-160°C selama 3-4 jam. Fase diam lain adalah alumina.

II.5.1.2.3 Membuat kolom (packing)

Pengemasan kolom dapat dilakukan dengan cara basah atau cara kering. Cara basah lebih mudah untuk memperoleh packing yang memberikan pemisahan yang baik. Sedangkan cara kering umumnya dilakukan untuk alumina.

Cara basah

Kedalam ujung kolom kromatografi (tempat keluarnya fase diam) diatas keran diletakkan gelas wool, tidak perlu ditekan kuat. Diatasnya ditaburkan pasir sehingga membentuk lapisan tebal + 1 cm. Selanjutnya dimasukkan petroleum eter sambil mencoba kecepatan menetes fase gerak dengan memutar keran. Di dalam beker gelas dibuat bubur fase diam dengan petroleum eter. Dengan bantuan batang pengaduk bubur dimasukkan kedalam kolom berisi petroleum eter. Sambil diketuk-ketuk butir-butir fase diam akan turun dan tersusun rapi didalam kolom. Bila kolom penuh dengan petroleum eter keran dibuka untuk menurunkan permukaannya dan petroleum eter yang keluar dapat digunakan lagi untuk membuat bubur fase diam. Packing dihentikan sampai panjang kolom yang dikehendaki. Selapis pasir diletakkan pada packing kolom untuk melindungi kolom. Kolom dijaga untuk tidak kering, maka diatas lapisan pasir harus selalu ada selapis fase gerak. Pada proses packing ini dinding luar kolom gelas disemprot dengan aseton. Penyemprotan dimaksudkan untuk mendinginkan kolom sehingga menghambat terbentuknya gelembung udara. Adapun untuk kolom yang

diameternya kecil fase diam kering dapat ditaburkan sedikit demi sedikit kedalam kolom yang berisi petroleum eter. Kolom ini digunakan setelah disimpan semalam.

Cara kering

Selapis pasir diletakkan didasar kolom, kemudian fase gerak dimasukkan lapis demi lapis sampai ditekan dengan karet atau alat penekan lain. Selain ditekan dapat juga dibantu dengan dihisap, sehingga dihasilkan packing fase diam yang mampat. Diatas fase diam diletakkan kertas saring dan diatasnya lagi sdapis pasir. Pada posisi keran terbuka fase gerak dituangkan dan dibiarkan mengalir keluar. Packing kolom disimpan dengan mempertahankan selapis fase gerak berada diatas lapisan pasir.

II.5.1.2.4 Penyiapan Sampel

Sampel ditimbang kemudian dilarutkan dalam pelarut yang sesuai, kemudian dituangkan hati-hati diatas packing kolom. Fase gerak dikeluarkan tetes demi tetes, diatur kecepatan menetesnya (tergantung besar-kecilnya kolom) dan dijaga kolom tetap terendam, untuk itu ditambah fase gerak perlahan-lahan dan dijaga tidak merusak packing kolom. Fase gerak yang keluar ditampung sebagai fraksi. Volume fraksi tergantung berat sampel dan pemisahan yang nampak pada kolom saat proses awal elusi ini. Makin kecil volume fraksi, akan diperoleh pemisahan yang lebih baik, namun akan dikumpulkan banyak fraksi. Untuk 10 gram sampel biasanya dikumpulkan fraksi dengan volume a 150 ml. Cara meletakkan sampel pada kolom yang lebih baik adalah dengan mencampur dengan fase diam. Satu bagian sampel dilarutkan dalam pelarut yang sesuai, biasanya pelarut yang digunakan adalah pelarut yang digunakan untuk pembuatan ekstrak. Larutan ekstrak ini kemudian dicampur dengan 2,0-3.0 bagian fase diam, dengan hati-hati campuran ini dikeringkan didalam rotary evaporator hingga diperoleh serbuk ekstrak kering. Serbuk ini ditaburkan diatas packing kolom dan ditutup dengan selapis pasir. Selanjutnya sampel siap dielusi.

II.5.2 Metode Titration

II.5.2.1 Metode Titration Asidimetri Alkalimetri untuk Analisa FFA

Titration merupakan suatu metode penentuan kadar (konsentrasi) suatu larutan dengan larutan lain yang telah diketahui konsentrasinya. Titration merupakan suatu metode untuk menentukan kadar suatu zat dengan zat lain yang sudah diketahui konsentrasinya. Atau juga bias disebut sebagai metode volumetri yaitu metode analisis kuantitatif yang didasarkan pada prinsip pengukuran volume.

Tahapan analisa FFA dengan menggunakan metode asidimetri alkalimetri dilakukan dengan menimbang 5 gr NPLF (Non Polar Lipid Fraction). Kemudian ditambahkan pelarut Benzene Alkohol dengan perbandingan 1:1 (v:v) sebanyak 50 ml. Setelah itu ditambahkan indikator PP dan dititration dengan KOH 0,1 N hingga berubah warna menjadi merah jambu dan menghitung kadar FFA.

$$= \frac{\text{ml.} \quad \text{normalitas} \quad 2 \quad 2 \quad (\text{olei} \quad \text{a} \quad \text{i})}{\text{erat min ak}} \quad 100$$

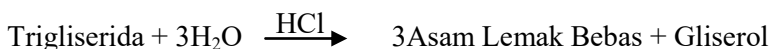
II.5.2.2 Metode Titration Oksidimetri Alkalimetri untuk Analisa Triglisierida, Diglisierida, dan Monoglisierida

Tahapan analisa kadar triglisierida dengan spektrofotometri UV-Vis dilakukan dengan menimbang 1 gram minyak kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Setelah itu, memasukkan alkohol dan HCl 0,5N masing-masing sebanyak 50 ml ke dalam erlenmeyer. Pendingin tegak perlu dipasang agar tidak ada alkohol yang teruapkan. Minyak dididihkan dalam erlenmeyer 1-2 jam hingga minyak terhidrolisa sempurna (indikator minyak telah terhidrolisa sempurna adalah larutan minyak, alkohol dan HCl tidak keruh). Langkah selanjutnya, mendinginkan minyak kemudian menambahkan alkohol absolute sebanyak 200 ml dan mengocok erlenmeyer agar alkohol dan minyak tercampur. Kemudian, menyaring dengan kertas saring whatman 40 sehingga diperoleh filtrat jernih dan memasukkan

filtrate jernih ke dalam kuvet. Setelah itu, mengukur nilai absorbansi pada panjang gelombang 285 nm dan menghitung jumlah gliserin

$$\text{gliserin} = \frac{\text{ilai a sor an s i sampel}}{\text{ilai a sor an s i stan ar t}} \times \text{onsentrasi larutan stan ar t}$$

Jumlah gliserin sama dengan jumlah trigliserida karena reaksi sebagai berikut:



Secara stoikiometri, jumlah trigliserida/digliserida/monogliserida sama dengan jumlah gliserol yang terbentuk setelah hidrolisa.

II.6 Studi Hasil Penelitian Sebelumnya

Penelitian-penelitian tentang minyak nyamplung (*Calophyllum inophyllum*), reaksi hidrolisis enzimatis, dan mikroorganisme penghasil enzim lipase yang telah dilakukan antara lain :

1. B.K. Venkanna dan C. Venkaratama Reddy (2009)

Melakukan penelitian dengan judul *Biodiesel Production and Optimization from Calophyllum inophyllum Linn. oil (honne oil)- three stage method*. Penelitian ini menggunakan tiga tahap untuk mendapatkan biodiesel dengan tahap pertama adalah *pre-treatment*. Pada tahap pertama, minyak nyamplung dengan kandungan FFA tinggi diubah menjadi trigliserida menggunakan metanol dengan katalis asam sulfat, dilakukan pada suhu 60°C selama 120 menit. Tahap kedua adalah transesterifikasi di mana larutan yang telah dipanaskan, ditambahkan *alkali methoxide* lalu dilakukan pengadukan dengan *mechanical stirrer*. Produk dibiarkan selama 8 jam, dan akan terbentuk dua lapisan atas dan bawah. Lalu, tahap ketiga adalah *post-treatment* di mana lapisan atas dari proses

transesterifikasi dicampur dengan *petroleum ester* lalu dipanaskan hingga suhu 65°C. Biodiesel dicampur dengan air pada suhu 60°C, kemudian dibiarkan selama 8 jam, dilakukan pencucian dan dipanaskan hingga 110°C selama 10 menit. Dari hasil penelitian didapat kesimpulan bahwa esterifikasi asam dengan 0,5 ml asam sulfat pada suhu 60°C selama 120 menit dengan perbandingan metanol dan minyak 4:1 memberikan konversi maksimum dari FFA menjadi trigliserida. Nilai asam berkurang dari 4,76 menjadi 1,64 mg KOH/g. Kondisi optimum dari transesterifikasi basa terjadi pada perbandingan molar 8:1, 1,25% KOH pada suhu 60°C dan waktu reaksi 120 menit.

2. Sylvie Crane dkk (2005)

Melakukan penelitian dengan judul *Composition of fatty acids triacylglycerols and unsaponifiable matter in Calophyllum calaba L. oil from Guadeloupe*. Pada penelitian ini, kandungan *physicochemical* antara *C. inophyllum* dan *C. calaba* dibandingkan. Didapatkan bahwa densitas dan *refractive index* *C. inophyllum* didapatkan 1,470. *C. inophyllum* memiliki *saturated fatty acid* sebesar 29,1% dan *unsaturated* sebesar 70,8%, serta kadar FFA *C. inophyllum* yang didapatkan dari penelitian ini adalah sebesar 5,1%.

3. Koda Risa, Takao Numata, Shinji Hama dkk. (2010)

Penelitian yang berjudul *ethanolysis of rapeseed oil to produce biodiesel fuel catalyzed by Fusarium heterosporum lipase-expressing fungus immobilized whole-cell biocatalyst* ini menghasilkan bahwa jamur *R.oryzae* dapat memproduksi enzim lipase tanpa adanya mutagenesi. Penerapan whole-cell dalam pembuatan biodiesel melalui reaksi etanolisis dilakukan pada temperatur ruangan dan keadaan atmosferik dapat

menghasilkan yield 96% dengan waktu reaksi selama 200 jam. Pada penelitian ini menggunakan *Aspergillus oryzae* dengan *carrier biomass support particle*. Minyak yang digunakan adalah *Rapeseed* yang direaksikan dengan methanol, ethanol, propanol, dan butanol. Biodiesel yang dihasilkan dari reaksi minyak dan metanol menghasilkan yield 96%. Sedangkan dengan etanol sebesar 94%, dengan propanol sebesar 96% dan butanol dengan yield 97%.

4. Ban dkk (2001)

Pada penelitian ini menggunakan *Rhizopus oryzae* IFO4697 yang diimmobilisasi dalam pembuatan biodiesel. *Whole-cell* yang digunakan diimmobilisasi menggunakan *biomass support particle* menghasilkan biodiesel dan 91,1% metil ester.

5. Pai, B. R. et. al. (1966)

Melakukan penelitian Mengenai kandungan Triterpenes yang ada pada *Calophyllum inophyllum linn.*. Hasil ekstraksi daun nyamplung dengan n-Heksane menghasilkan campuran solida yang mengandung triterpenes yang kemudian di uji menggunakan *Chromatography* untuk membuktikannya. Hasil *Chromatography* menunjukkan bahwa sampel mengandung 4 jenis komponen kristal, A, B, C, dan D yang dibedakan menurut tingkat kepolarannya. Dimana kristal A tersusun atas 3 triterpenes yaitu *canophyllal*, *canophyllol*, dan *canophyllic acid*. Kristal B dianalisa sebagai senyawa dengan rumus molekul $C_{30}H_{48}O_3$. Sementara kristal C dianalisa sebagai komponen dengan rumus molekul $C_{30}H_{50}O_2$. Dan Komponen D, dianalisa senbagai komponen dengan rumus molekul $C_{30}H_{50}O_3$.

6. Friday, J. B. And Okano, D. (2006)

Dalam Penelitiannya yang berjudul *Calophyllum inophyllum* telah disebutkan bahwa tanaman ini merupakan jenis tanaman yang dapat hidup di daerah dengan suhu tropis dan biasanya seringkali ditemukan disekitar bibir pantai. *Calophyllum inophyllum* tumbuh ditempat yang bertemperatur hangat atau sedang dan tidak cocok tumbuh pada area yang sangat dingin dengan udara yang kering. *Calophyllum inophyllum* ini memiliki banyak manfaat, selain sebagai bahan obat-obatan dan untuk membuat *furniture*, Tanaman ini memiliki kurang lebih 190 species, kebanyakan berasal dari Asia dan Kepulauan Pasifik. Bahkan di Indonesia, beberapa species bahkan dikatakan langka dan hanya ada di Indonesia.

7. Pretto, J.B. et. al. (2004)

Pretto et. al. Membuat suatu penelitian yang bertujuan untuk mencari fraksi / komponen yang bersifat sebagai antimikroba yang terdapat dalam *Calophyllum Brasiliensi*. Prosedurnya adalah, bagian tanaman yang akan digunakan untuk percobaan (akar, batang, daun, dan buah) dihilangkan kandungan airnya dan dijadikan bentuk serbuk. Setelah itu kemudian bahan tersebut di maserasi dengan menggunakan methanol selama 7 hari dan didiamkan pada suhu ruangan. Setelah diambil larutan ekstraknya kemudian dievaporasi untuk menghilangkan sisa campuran pelarut yang masih ada. Setelah itu kemudian *crude extract* dilarutkan dalam chloroform untuk memisahkan fraksi polar dan nonpolarnya. Fraksi polar dan non polar kemudian di uji kandungannya menggunakan TLC. Untuk menguji sifat antimikroba ekstrak, digunakan beberapa mikroorganisme, diantaranya : *Bacillus Aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Eschericia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas*

Aeruginosa, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus agalactiae*, *Candida albicans*, dan *Candida tropicalls*. Dari hasil penelitian didapatkan bahwa dari ke empat bagian tanaman tersebut, tanaman yang memiliki sifat antimikroba paling baik adalah pada bagian daun.

8. Malarvizhi P dan Ramakhrisnan N (2011)

Penelitian yang berjudul GC-MS analysis of biologically active compound in leaves of *Calophyllum inophyllum* ini menghasilkan bahwa ekstrak dari *Calophyllum inophyllum* ini mengandung banyak hydrocarbon, komponen phenolic da grup keton. Penelitian ini menggunakan daun *Calophyllum inophyllum* yang telah dibuat menjadi serbuk yang kemudian di maserasi dengan alkohol selama 24 jam. Ekstrak kemudian disaring dari ampasnya, kemudian dikentalkan lalu di analisa menggunakan GC-MS.

9. Andersen (1994)

Penelitian yang berjudul *Partial Purification and charactetrisation of lipase from L.plantarum* ini menghasilkan bahwa lipase dari strain ini dapat diproduksi pada tem[eratur 30-37⁰C. Ada beberapa tahapan pemroduksian lipase dari strain jamur ini agar didapatkan enzim lipase murni, diantaranya adalah pembilasan dengan aquadest dan beberapa solvent.

10. Malarvizhi P dan Ramakhrisnan N (2011)

Penelitian yang berjudul GC-MS analysis of biologically active compound in leaves of *Calophyllum inophyllum* ini menghasilkan bahwa ekstrak dari *Calophyllum inophyllum* ini mengandung banyak hydrocarbon, komponen phenolic da grup keton. Penelitian ini menggunakan daun *Calophyllum inophyllum* yang telah

dibuat menjadi serbuk yang kemudian di maserasi dengan alkohol selama 24 jam. Ekstrak kemudian disaring dari ampasnya, kemudian dikentalkan lalu di analisa menggunakan GC-MS.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

III.1 Proses Hidrolisis Triglisierida dan Variabel

1. Pemisahan dengan ekstraksi liquid-liquid
 - a. Liquid yang digunakan berupa minyak nyamplung 100 g
 - b. Pelarut yang digunakan adalah petroleum eter (PE) - methanol 98% dengan rasio = 3:1 (g/g)
 - c. Rasio pelarut : minyak nyamplung = 5 : 1 (g/g)
 - d. Ekstraksi multiple = 8 kali
2. Hidrolisis triglisierida NPLF minyak nyamplung
 - a. Jenis mikroorganisme = *Rhizopus oryzae* dan *L.Plantharum*
 - b. Jumlah mikroorganisme = 1×10^{12} sel/mL mixture,
 5×10^{12} sel/mL mixture,
 10×10^{12} sel/mL mixture.
 - c. Lama waktu hidrolisis = 1 hari, 2 hari, 3 hari, 4 hari, dan 5 hari.
3. Identifikasi produk
 - a. Ekstrak NPLF minyak nyamplung diuji menggunakan TLC dan kolom kromatografi.
 - b. Hasil hidrolisis diuji dengan TLC ,metode titrasi dan kolom kromatografi.

III.2 Bahan dan Peralatan

III.2.1 Bahan

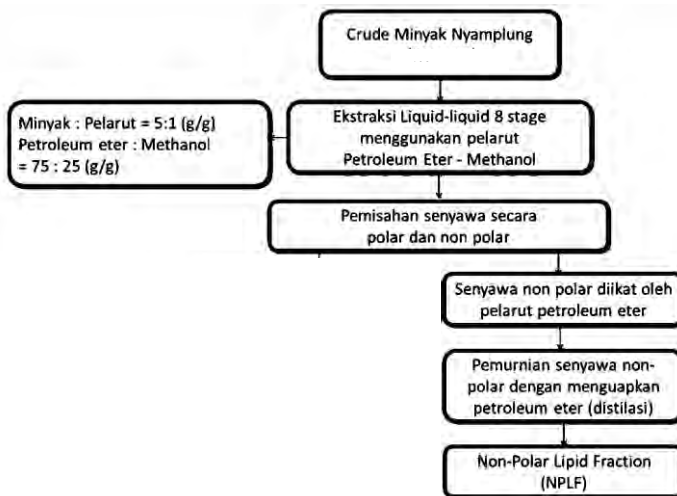
- | | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|
| 1. Minyak biji nyamplung | 9. Akuades |
| 2. Metanol (98%) teknis | 10. Kertas Saring |
| 3. Petroleum eter teknis | 11. Asam Asetat |
| 4. N-Hexane | 12. Etil Asetat |
| 5. <i>Rhizopus oryzae</i> | 13. Kertas TLC |
| 6. <i>Lactobacillus plantarum</i> | 14. NaOH |
| 7. Iodine | 15. NaNO ₃ |
| 8. Potato Dextrose Agar | 16. KH ₂ PO ₄ |

Duta Prima. Mikoorganisme *L.plantarum* didapatkan dari laboratorium mikrobiologi jurusan Teknik Kimia, FTI-ITS. *Rhizopus oryzae* didapatkan dari Koperasi Tani Subur di Malang, Jawa Timur berupa ragi tempe. Media PDA (Potato Dextrose Agar), Urea, NaNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KOH, Etanol dan indikator PP didapat dari jurusan Teknik Kimia FTI ITS.

III.3.2 Prosedur Penelitian

III.3.2.1 Ekstraksi *Crude* Minyak Nyamplung

1. Menyiapkan *crude* minyak nyamplung seberat 100 gram dan Petroleum Eter 375 gram, dan Metanol 125 gr.
2. Mencampurkan *crude* minyak dan petroleum eter ke dalam beakerglass dan mengaduknya selama 15 menit menggunakan strirrer magnetik.
3. Menambahkan metanol ke dalam campuran *crude*-petroleum eter. Kemudian di-*stir* menggunakan *stirrer* magnetik selama 15 menit.
4. Memindahkan campuran di dalam *beaker glass* ke dalam corong pemisah. Pada tahap ini, akan terlihat bahwa *crude* terlarut ke dalam dua fraksi, yaitu fraksi methanol (fraksi polar) dan fraksi petroleum eter (fraksi non-polar). Pada tahap ini dilakukan pemisahan antara fraksi metanol dan fraksi petroleum eter. Fraksi petroleum eter yang didapatkan dipisahkan di beaker glass.
5. Tambahkan 125 gr metanol ke dalam beaker glass dan diaduk selama 15 menit.
6. Mengulangi pencucian menggunakan metanol hingga mencapai stage 8.
7. Fraksi petroleum eter-NPLF yang didapat dari stage 8 didestilasi untuk memisahkan pelarut (PE) dan NPLF.



Gambar III.1 Skema Tahapan Ekstraksi Fraksi NPLF

III.3.2.2 Pengembangan Kultur

Lactobacillus plantarum

1. Melarutkan 1,25 gram agar batang dengan aquadest hingga volumenya 100 ml.
2. Mendidihkan sampai suhu 70°C hingga semua agar melarut.
3. Menambahkan 0,3 gram glukose dan 0,8 gram Nutrient Broth dan menunggu hingga semua larut.
4. Memasukkan dalam tabung reaksi masing-masing 6 ml dan menutup mulut tabung dengan kapas.
5. Mensterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit, lalu mendinginkannya dengan posisi miring.
6. Setelah agar mengeras, mengambil biakan murni dengan kawat ose steril dalam incase.
7. Menggoreskan kawat ose pada permukaan media agar yang baru dan menutup kembali dengan kapas.
8. Menginkubasi dalam inkubator pada suhu 30°C selama 24 jam.

Rhizopus oryzae

1. Melarutkan 0,6 gram agar batang dengan aquadest hingga volumenya 100 ml.
2. Mendidihkan sampai suhu 70°C hingga semua agar melarut.
3. Menambahkan 3,9 PDA dan menunggu hingga semua larut.
4. Memasukkan dalam petridish masing-masing 10 ml.
5. Mensterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
6. Setelah agar mengeras, mengambil 0,1 gram ragi tempe dan menanam kultur dalam incase.
7. Menginkubasi dalam inkubator pada suhu 30°C hingga fase log.

Inkubasi *Rhizopus oryzae* pada media basal

1. Menimbang Urea 35 gr, NaNO₃ 0,5 gr, KH₂PO₄ 0,5 gr, MgSO₄.7H₂O 0,25 gr, NPLG 5 gram. Kemudian menambahkan larutan buffer sitrat pH 5,5 hingga 500 mL.
2. Mengaduknya menggunakan magnetik stirer hingga rata.
3. Mensterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
4. Mengambil 40 mL media basal dan membiakan kapang dari petridish PDA dengan kawat ose steril dalam incase kedalam media basal.
5. Media dan kultur diinkubasi pada suhu 30°C hingga fase log.

III.3.2.3 Proses Hidrolisis Triglicerida

Lactobacillus plantarum

1. *Non Polar Lipid Fraction* dari minyak nyamplung sebanyak 10 gram ditambahkan dengan 30 gr air.
2. Menambahkan 5,34 gram urea sebagai sumber nutrient mikroorganisme.

3. Menambahkan *L.plantarum* sesuai variabel yang diinginkan, kemudian dishaker pada 150 rpm, pada suhu ruang 30°C selama variabel waktu yang sudah ditentukan.

Rhizopus oryzae

1. *Non Polar Lipid Fraction* dari minyak nyamplung sebanyak 10 gram ditambahkan dengan 30 gr air.
2. Menambahkan *L.plantarum* sesuai variabel yang diinginkan, kemudian dishaker pada 150 rpm, pada suhu ruang 30 °C selama variabel waktu yang sudah ditentukan.

III.3.2.4 Proses Penghentian Hidrolisis

Prosedur penghentian hidrolisa dilakukan dengan menambahkan n-Hexane sebanyak 10 gram ke dalam erlenmeyer yang berisi campuran minyak dengan air. Dari proses tersebut akan didapatkan dua fase cairan, yakni fraksi hexane yang mengandung asam lemak dan trigliserida, serta fraksi air yang mengandung gliserol. Fraksi n-Hexane kemudian diuapkan, agar terpisah antara minyak dengan pelarutnya. Setelah itu, minyak dapat diuji.

III.3.3 Analisa Hasil Hidrolisa

III.3.3.1 Analisa Jumlah Sel

Menurut Caprette (2007) metode menghitung jumlah sel menggunakan suatu alat yang disebut dengan *counting chamber* (ruang hitung). Alat ini dapat digunakan untuk menghitung jumlah sel per unit volume. Tipe *counting chamber* yang paling banyak digunakan adalah *haemocytometer*.



Gambar III.2 *Haemacytometer* Neubauer

Berikut ini langkah-langkah yang dilakukan untuk analisa jumlah sel bakteri :

1. Mengencerkan 1 ml sampel sebesar 1 – 10 kali atau lebih dengan menggunakan aquades.
2. Meneteskan ke permukaan *counting chamber* hingga dapat menutupi seluruh permukaannya.
3. Kemudian *haemacytometer* diletakkan di bawah lensa mikroskop untuk dihitung jumlah selnya.
4. Melakukan pengamatan di mikroskop dengan perbesaran 400 X.

III.3.3.2 Analisis Kadar Trigliserida, Digliserida, dan Monoglisliserida

Analisa kadar trigliserida, digliserida, dan monoglisliserida dilakukan oleh Badan Penelitian dan Konsultasi Industri (BPKI), Surabaya. Sebelum mendapatkan kadar kadar trigliserida, digliserida, dan monoglisliserida sampel diisolasi menggunakan metode kolom kromatografi. Setelah diisolasi dilanjutkan dengan identifikasi menggunakan kertas TLC. Lalu dilakukan langkah analisa selanjutnya. Untuk analisa kadar trigliserida, perlu dilakukan hidrolisa terlebih dahulu, lalu dilihat pada spektrofotometer. Untuk digliserida dan monogliserida, akan langsung dilihat di spektrofotometer.

III.3.3.2.1 Metode kolom Kromatografi

Pada proses analisa kolom kromatografi ini dilakukan menggunakan kolom kromatografi dengan silika gel sebagai fase

diam dan larutan heksana: benzene (1:1) sebagai fase gerak. Sampel minyak sebanyak 1 gram dimasukkan ke dalam kolom secara perlahan lalu dielusikan dengan campuran heksana: benzene (1:1). Setiap fraksi dikumpulkan sebanyak 1 mL. fraksinasi dihentikan bila hasil fraksi sudah terlihat jernih. Komposisi hasil sampel tiap-tiap fraksi dianalisis menggunakan metode TLC.

III.3.3.2.2 Tahap Titration Oksidimetri dan Spektrofotometri UV-Vis

Setelah diisolasi menggunakan proses kolom kromatografi, trigliserida, digliserida dan monogliserida dihitung sebagai % gliserin yang dihitung dengan titration oksidimetri.

Tahapan analisa kadar trigliserida dengan spektrofotometri UV-Vis dilakukan dengan menimbang 1 gram minyak kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Setelah itu, memasukkan alkohol dan HCl 0,5N masing-masing sebanyak 50 ml ke dalam erlenmeyer. Pendingin tegak perlu dipasang agar tidak ada alkohol yang teruapkan. Minyak dididihkan dalam erlenmeyer 1-2 jam hingga minyak terhidrolisa sempurna (indikator minyak telah terhidrolisa sempurna adalah larutan minyak, alkohol dan HCl tidak keruh). Langkah selanjutnya, mendinginkan minyak kemudian menambahkan alkohol absolute sebanyak 200 ml dan mengocok erlenmeyer agar alkohol dan minyak tercampur. Kemudian, menyaring dengan kertas saring whatman 40 sehingga diperoleh filtrat jernih dan memasukkan filtrat jernih ke dalam kuvet. Setelah itu, mengukur nilai absorbansi pada panjang gelombang 285 nm dan menghitung jumlah gliserin.

larutan

Jumlah gliserin sama dengan jumlah trigliserida karena reaksi sebagai berikut:

Trigliserida + $3\text{H}_2\text{O}$ $\xrightarrow{\text{HCl}}$ 3Asam Lemak Bebas + Gliserol
Secara stoikiometri, jumlah trigliserida/digliserida/monogliserida sama dengan jumlah gliserol yang terbentuk setelah hidrolisa.

III.3.3.3 Analisis Kadar FFA (Free Fatty Acid) menggunakan metode asidi alkalimetri

Tahapan analisa FFA dengan menggunakan metode asidi alkalimetri dilakukan dengan menimbang 5 gr NPLF (Non Polar Lipid Fraction). Kemudian ditambahkan pelarut Benzene Alkohol dengan perbandingan 1:1 (v:v) sebanyak 50 ml. Setelah itu ditambahkan indikator PP dan dititrasi dengan KOH 0,1 N hingga berubah warna menjadi merah jambu dan menghitung kadar FFA.

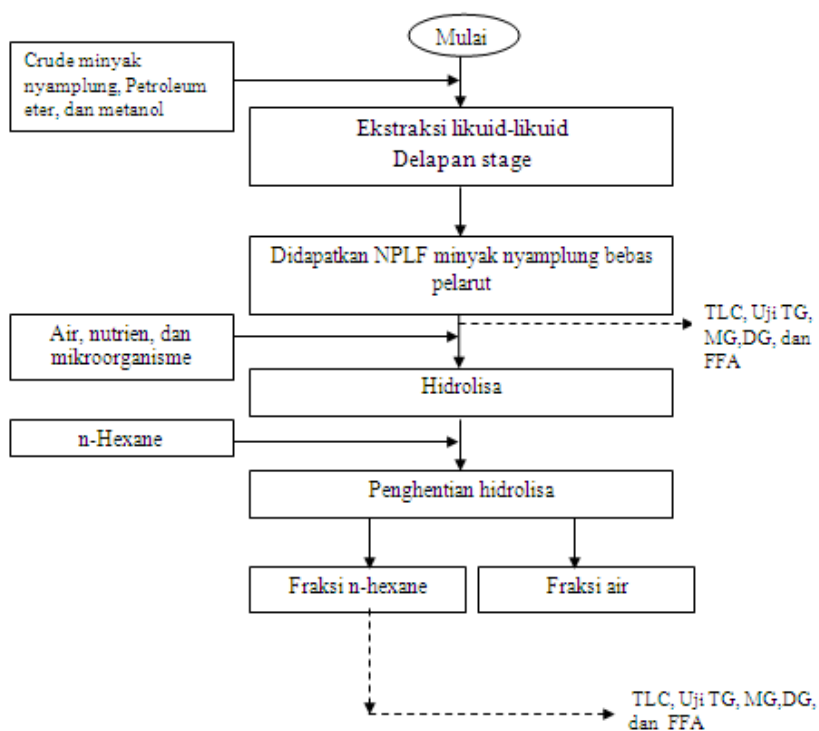
III.3.3.4 Analisa Menggunakan TLC

Fraksi nonpolar yang didapatkan kemudian di uji kandungannya menggunakan TLC (*Thin Layer Chromatography*). TLC digunakan untuk menguji secara kualitatif ada atau tidaknya senyawa trigliserida di dalam fraksi nonpolar minyak nyamplung ini. Untuk mengetahui secara kuantitatif kandungan TG dalam minyak nyamplung digunakan TLC plate. Sebelum uji TLC mula-mula kertas TLC yang telah ditetesi oleh sampel direndam dalam mobile phase dengan kadar hexane:etil asetat:asam asetat sebesar 90:10:1 (v). Pada saat perendaman tidak diperkenankan tinggi mobile phase melebihi area yang telah ditentukan pada kertas TLC. Setelah perendaman dengan mobile phase dalam botol tertutup rapat, kertas TLC dikeringkan pada suhu ruang kemudian dilakukan pewarnaan menggunakan iodin dengan takaran campuran iodin dan silica gel sebanyak 1/4 sendok teh iodin dicampur dengan 2 sendok makan silica gel kemudian dicampur dalam botol yang tertutup rapat, Kertas TLC yang telah direndam mobile phase tersebut dimasukkan dalam botol yang berisi iodin kemudian campur

kertas TLC tersebut dengan iodine hingga terbentuk spot-spot pada kertas TLC. Fungsi dari iodine dan silica gel tersebut adalah untuk memberi warna pada sampel yang telah ditetaskan pada kertas TLC tersebut.

Pada pembacaan di kertas TLC selain menggunakan iodine dapat juga menggunakan lampu UV, yaitu dengan cara setelah kertas TLC direndam dalam mobile phase, kertas TLC disinari dengan menggunakan lampu UV gelombang 366 nm.

III.3.4 Skema Penelitian



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kelayakan penggunaan metode *whole-cell microbial* sebagai sumber enzim proses hidrolisis enzimatis trigliserida, mengetahui pengaruh jenis mikroorganisme penghasil enzim (*whole-cell*) pada reaksi hidrolisis trigliserida, mempengaruhi jumlah mikroorganisme penghasil enzim (*whole-cell*) pada reaksi hidrolisis trigliserida, dan mengetahui pengaruh waktu pada reaksi hidrolisis trigliserida.

Pada penelitian ini akan dipelajari proses pemisahan awal hingga proses hidrolisis dari fraksi lemak non polar (*NonPolar Lipid Fraction*, NPLF) dari minyak nyamplung mentah, dengan menggunakan metode sebagai berikut :

1. Proses pemisahan fraksi lemak polar (PLF) menggunakan metode ekstraksi liquid-liquid (*Liquid-liquid extraction*, LLE) dengan *solvent* metanol dan petroleum eter secara *multistage*, sebanyak 8 stage.
2. Proses hidrolisa enzimatis menggunakan *whole-cell microbial* (*Rhizopus oryzae* dan *Lactobacillus plantarum*)

Hasil dari tahapan proses tersebut dianalisa menggunakan TLC (*Thin Layer Chromatography*) dan UV-VIS untuk analisa kuantitatif, titrasi serta kolom kromatografi yang dilanjutkan dengan titrasi oksidialkalimetri untuk analisa kuantitatif.

Pada tahapan proses ekstraksi *liquid-liquid* multistage, minyak nyamplung sebelumnya berwarna hijau kehitaman, dan gelap setelah melewati proses ekstraksi, menghasilkan fraksi polar minyak nyamplung berwarna hijau gelap serta fraksi non polar yang berwarna kekuningan.

Pada penelitian ini, diharapkan produk dari fraksi non polar minyak nyamplung mengandung kadar trigliserida tinggi dan dapat dihidrolisa agar terpecah menjadi senyawa-senyawa asam lemak pembentuknya dan gliserol.

IV.1 Ekstraksi *Liquid-liquid* Non Fraksi Lemak Polar (NPLF) dari *Crude Minyak Nyamplung*

Metode ekstraksi *liquid-liquid* ini menggunakan dua jenis pelarut, yaitu petroleum eter dan metanol. Pemilihan kedua *solvent* ini berdasarkan pada indeks polaritas, di mana metanol adalah senyawa agak polar dengan indeks polaritas sebesar 5,1 sedangkan petroleum eter merupakan senyawa non-polar dengan indeks polaritas 0 (Sadek, 2002). Dengan dua sifat polaritas yang berbeda inilah, diharapkan senyawa polar yang terkandung dalam *crude* akan terlarut dalam metanol dan senyawa tidak polarnya akan terlarut dalam fraksi petroleum eter.

Proses ekstraksi ini dimulai dengan penimbangan *crude* minyak nyamplung seberat 100 gram, dan rasio perbandingan antara *crude* dengan *solvent* yang digunakan adalah 1:5 gram/gram. Sementara itu, rasio perbandingan antara petroleum eter dan metanol yang digunakan adalah 3:1 gram/gram.

Crude minyak nyamplung yang telah ditimbang selanjutnya dimasukkan ke dalam *beaker glass*, kemudian ditambahkan metanol. Campuran *crude* minyak dan metanol ini kemudian di-*stir* menggunakan *stirrer* magnetik selama 15 menit. Langkah ini bertujuan agar metanol mengikat seluruh komponen polar di dalam *crude* terlebih dahulu. Setelah 15 menit, kemudian ditambahkan petroleum eter ke dalam campuran *crude* dan metanol yang telah di-*stir* sebelumnya, kemudian dilakukan pengadukan lagi selama 15 menit. Pada *stir* kedua ini, komponen yang agak polar sampai non-polar akan terikat di dalam petroleum eter. Selain untuk melarutkan dan mempermudah transfer massa, langkah ini juga bertujuan untuk mempersingkat waktu pemisahan di langkah selanjutnya.

Campuran di dalam *beaker glass* kemudian dipindahkan ke dalam corong pemisah. Pada tahap ini, akan terlihat bahwa *crude* terlarut ke dalam dua fraksi, yaitu fraksi methanol (fraksi polar) dan fraksi petroleum eter (fraksi non-polar). Karena *crude* minyak nyamplung berwarna kehitaman, dibutuhkan pencahayaan lebih untuk melihat pemisahan fraksi polar dan non-polar yang

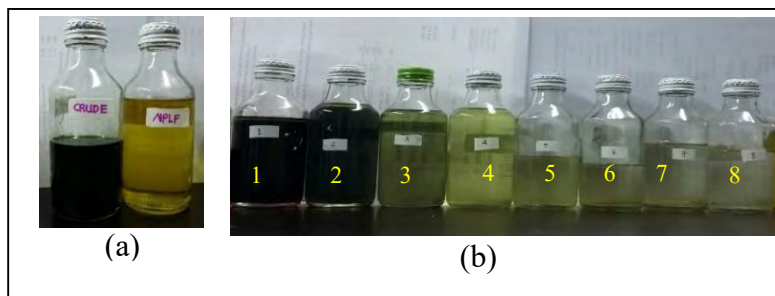
ditunjukkan dengan *layer* yang terbentuk di dalam corong pemisah. Berikut adalah gambaran *layer* yang terbentuk saat ekstraksi pada *stage* pertama.



Gambar IV.1 *Layer* di Corong Pemisah *Stage* 1

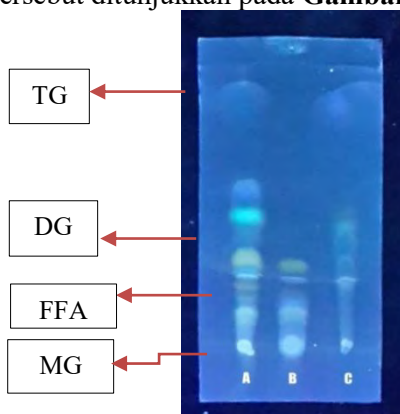
Pada **Gambar IV.1**, terdapat dua bagian, dimana bagian atas adalah *layer* petroleum eter yang melarutkan fraksi non-polar, dan bagian bawah adalah *layer* metanol yang melarutkan fraksi polar. Pada gambar tersebut, fraksi polar terlihat lebih sedikit karena perbandingan rasio antara metanol yang lebih kecil dibandingkan dengan petroleum eter. Ekstraksi kemudian dilanjutkan ke *stage* selanjutnya hingga 8 *stage*. Semakin banyaknya jumlah *stage* yang dijalankan akan terlihat bahwa fraksi methanol akan semakin bersih. Hal ini dikarenakan fraksi yang polar yang melarut di dalam methanol pun semakin sedikit karena senyawa polar telah dihilangkan di setiap *stage* (Aparamarta dkk, 2016).

Setelah mencapai *stage* 8, fraksi petroleum ether kemudian diuapkan untuk memurnikan fraksi non polar (NPLF) dari petroleum ether. Dari metode ini, didapatkan fraksi petroleum ether sebanyak 3026,716 gram (NPLF) dari jumlah crude minyak nyamplung awal sebanyak 4835,165 gram.



Gambar IV.2 (a) Crude Minyak Nyamplung dan NPLF Hasil Ekstraksi (b) PLF Hasil Ekstraksi dari Stage 1 hingga Stage 8

Pada **Gambar IV.2** memperlihatkan hasil dari proses pemisahan, yakni *Non Polar Lipid Fraction* berupa cairan kental berwarna kekuningan dan *Polar Lipid Fraction* yang memiliki warna berbeda disetiap stagenya. Kadar FFA (*free fatty acid*) diuji menggunakan metode asidi alkalimetri. Kadar FFA (*free fatty acid*) sebesar 3,5 % (g/g). Densitas NPLF 9,07 gr/mL. Selanjutnya dilakukan analisa secara kualitatif menggunakan TLC untuk masing-masing fraksi dan dibandingkan dengan *crude*. Hasil analisa tersebut ditunjukkan pada **Gambar IV.3** berikut:



Gambar IV.3 Hasil analisa TLC menggunakan lampu UV. (A) *crude* minyak nyamplung; (B) fraksi polar; dan (C) fraksi non-polar

Dari hasil analisa pada **Gambar IV.3** dapat diketahui bahwa pada awalnya *crude* nyamplung mengandung *triglyceride*, *diglyceride*, *free fatty acid*, dan *monoglyceride*. Hal ini dibuktikan dengan adanya *spot* yang terpisah pada pelat TLC. Setelah *crude* mengalami proses ekstraksi, komponen-komponen seperti asam lemak akan mengalami penurunan. Pernyataan ini terbukti pada fraksi polar setelah pencucian memiliki *spot* semakin sedikit dibandingkan *crude*. Komponen yang masih terdapat di dalam fraksi polar minyak nyamplung jika dilihat berdasarkan hasil TLC di atas adalah *free fatty acid* yang mengalami penurunandan *monoglyceride*. Sementara *triglyceride* dan *diglyceride* tidak terlihat pada fraksi polar minyak nyamplung

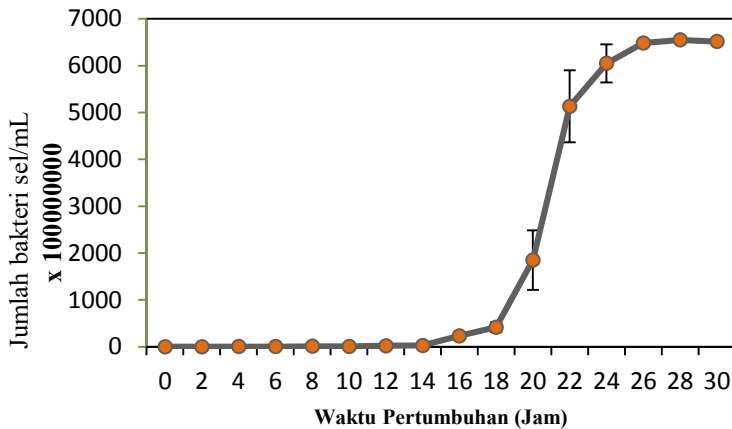
Pada fraksi non-polar, terdapat *spot* yang mirip seperti di *crude*. Hal ini menunjukkan bahwa komponen-komponen seperti asam lemak dan hidrokarbon larut pada fraksi petroleum eter. Selain itu pada **Gambar IV.3** di atas juga menunjukkan bahwa pemisahan berhasil dilakukan. Analisa TLC ini hanya merupakan analisa secara kualitatif.

IV.2 Kurva Pertumbuhan Mikroorganisme

IV.2.1 Kurva Pertumbuhan *Lactobacillus plantarum*

Langkah awal untuk menentukan jumlah variabel mikroorganisme pada penelitian ini adalah melakukan kalibrasi kurva pertumbuhan bakteri yang akan digunakan untuk hidrolisa. Hal ini dilakukan dengan menghitung jumlah sel *Lactobacillus plantarum* untuk mengetahui laju pertumbuhannya. Perhitungan jumlah sel ini dilakukan dengan interval 2 jam. Menurut Talpur, *et al.* (2012) sel *Lactobacillus plantarum* memiliki laju pertumbuhan yang sangat cepat. Kurva pertumbuhan bakteri ini digunakan untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan bakteri untuk mencapai jumlah sel tertentu, yang kemudian akan digunakan sebagai variabel konsentrasi starter untuk hidrolisa. Terdapat empat fase dalam pertumbuhan bakteri. Fase awal adalah fase adaptasi, di mana belum terlihat pertumbuhannya. Kemudian bakteri ini menuju fase

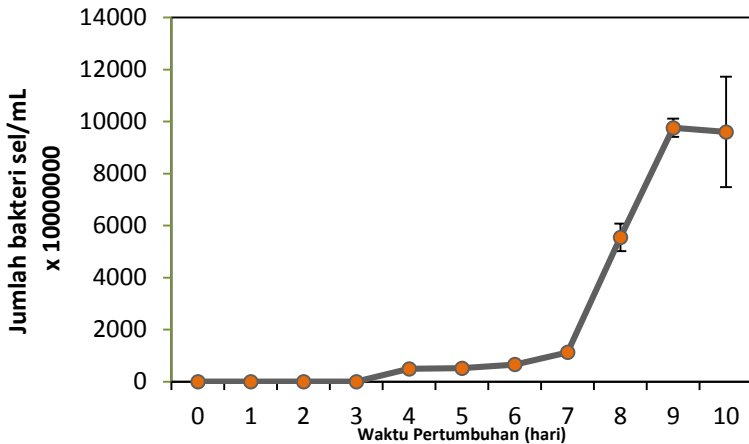
logaritmik, yaitu fase pertumbuhan sangat cepat hingga waktu tertentu. Kemudian bakteri memasuki fase stasioner, yaitu ketika sudah tidak terjadi pertumbuhan lagi karena jumlah bakteri yang hidup dan yang mati sama, namun bakteri masih melakukan aktivitasnya. (Tortora, 2010).



Gambar IV.4 Kurva Pertumbuhan *Lactobacillus plantarum*

Kurva pertumbuhan *Lactobacillus plantarum* pada **Gambar IV.4** menggunakan biakan $1 \times 1 \text{ cm}^2$ pada media *Nutrient Broth Agar*. Perhitungan jumlah bakteri ini digunakan untuk mengetahui jumlah bakteri pada saat 10^{12} sel/mL, 5×10^{12} juta sel/mL, dan 10×10^{12} juta sel/mL sesuai dengan variabel penelitian. Fase adaptasi terjadi pada jam ke-0 hingga jam ke-16. Kemudian fase log berlangsung pada jam ke-16 hingga jam ke-28. Fase statis terjadi setelahnya. Hal ini sedikit berbeda dari penelitian yang pernah dilakukan Horn (2005), dikatakan bahwa *Lactobacillus plantarum* mengalami fase log pada jam ke-3 hingga jam ke-15 dengan MRS broth sebagai media tumbuh. Hal ini dapat dikarenakan oleh adanya perbedaan media tumbuh yang digunakan. Pada penelitian ini menggunakan NBA, sedangkan penelitian terdahulu menggunakan MRS broth.

IV.2.2 Kurva Pertumbuhan *Rhizopus oryzae*



Gambar IV.5 Kurva Pertumbuhan *Rhizopus oryzae*.

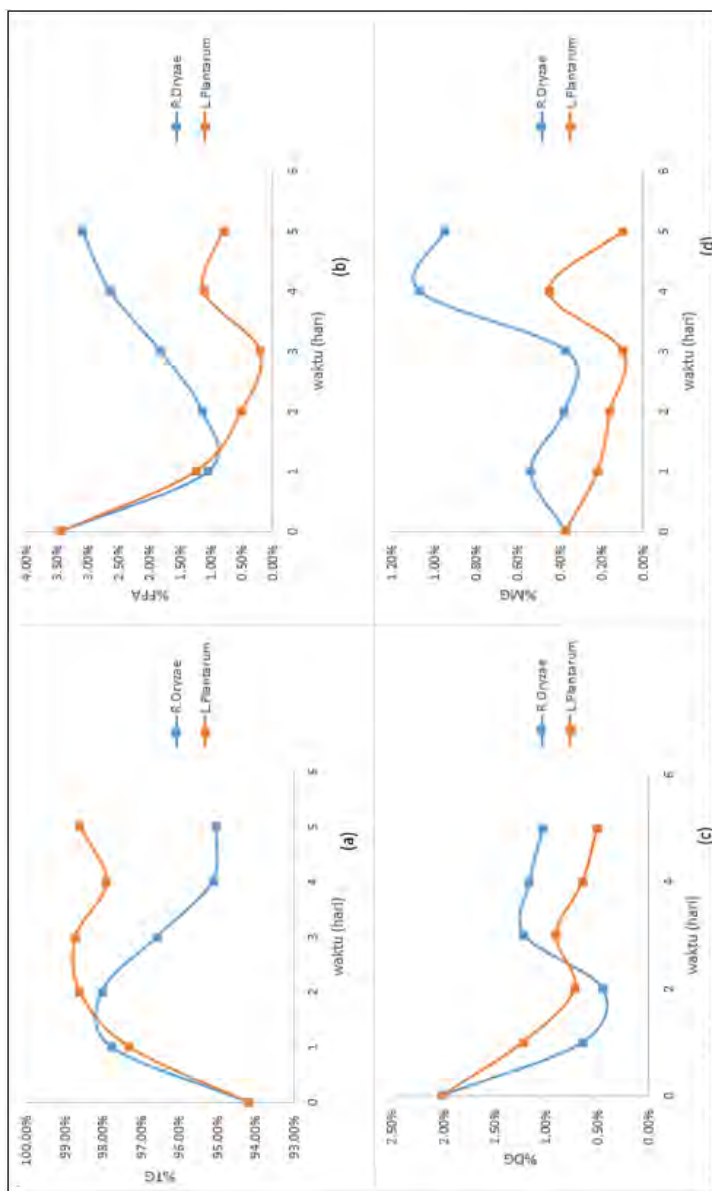
Kurva pertumbuhan *Rhizopus oryzae* pada **Gambar IV.5** menggunakan biakan $1 \times 1 \text{ cm}^2$ pada media *Potato Dextrose Agar*. Perhitungan jumlah bakteri ini digunakan untuk mengetahui jumlah bakteri pada saat 10^{12} sel/mL, 5×10^{12} juta sel/mL, dan 10×10^{12} juta sel/mL sesuai dengan variabel penelitian. Fase adaptasi terjadi pada hari ke-0 hingga hari ke-4. Fase ini ditandai dengan belum adanya pertumbuhan kapang yang signifikan. Kemudian fase log berlangsung pada hari ke-4 hingga hari ke-9. Hal ini ditandai dengan meningkatnya pertumbuhan kapang secara signifikan. Fase statis terjadi setelahnya. Fase statis ditandai dengan landainya garis pertumbuhan. Hal ini menunjukkan jika sudah tidak terjadi pertumbuhan lagi karena jumlah bakteri yang hidup dan yang mati sama, namun bakteri masih melakukan aktivitasnya (Tortora, 2010).

IV.3 Proses Hidrolisa

Dalam proses hidrolisa NPLF (*Non Polar Lipid Fraction*) minyak nyamplung dilakukan dengan mereaksikan minyak, air dan mikroorganisme (*R.Oryzae* dan *L.Plantarum*) sebagai biokatalis. Proses hidrolisa diawali dengan menimbang minyak NPLF sebanyak 10 gram dan air sebanyak 30 gram. Menurut Sharma (2013), perbandingan minyak dengan air yang digunakan untuk hidrolisa sebanyak 1:3 (g/g) sudah dapat terjadi proses hidrolisa. Setelah itu, ditambahkan mikroorganisme sesuai dengan variable yang telah ditentukan, serta urea sebanyak 5,34 gr sebagai sumber nutrisi untuk mikroorganisme. Kemudian di-shaker dengan kecepatan 150 rpm dengan kondisi operasi 30 °C hingga waktu yang ditentukan.

Pada reaksi hidrolisis terjadi proses pemecahan trigliserida menjadi gliserol dan free fatty acid. Pada penelitian ini digunakan katalis whole cell sebagai penghasil lipase. Dimana *R.Oryzae* dan *L.Plantarum* merupakan salah satu mikroorganisme penghasil lipase.

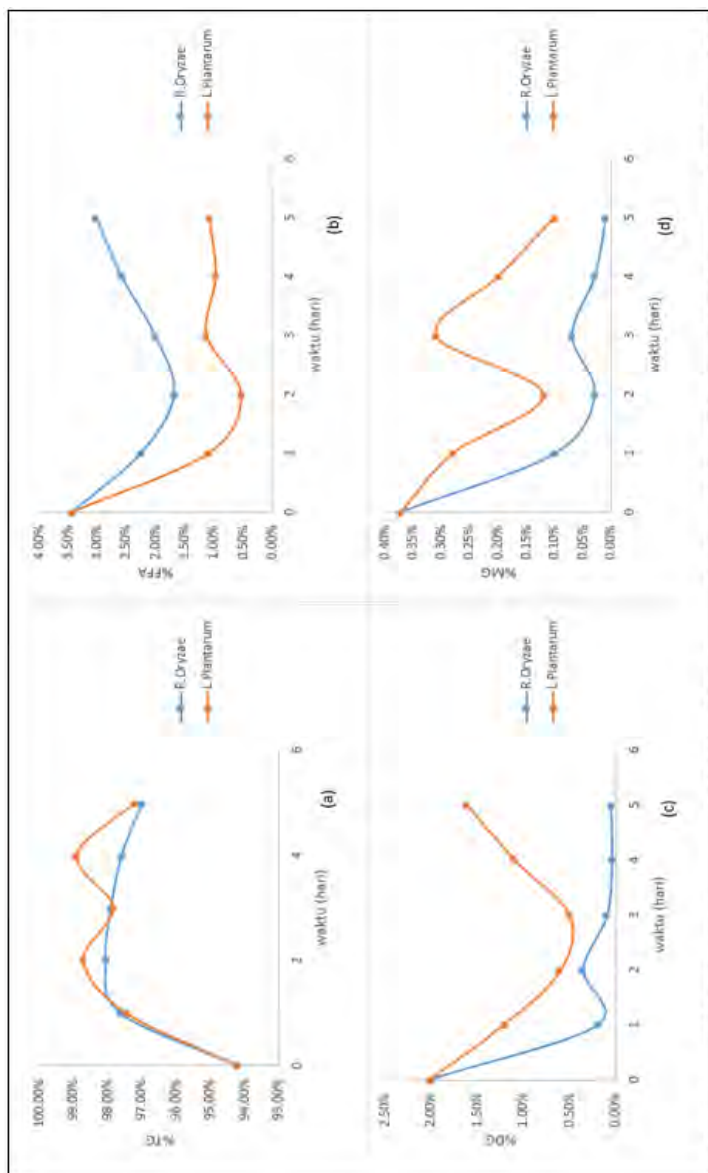
Kadar trigliserida, FFA (*Free Fatty Acid*), digliserida dan monogliserida tinggi dapat mempengaruhi proses esterifikasi. Dalam reaksi hidrolisa trigliserida, lama waktu hidrolisa berpengaruh terhadap kadar trigliserida.



Gambar.IV.6 Grafik Pengaruh Waktu hidrolisa terhadap Kadar Triglicerida (a), FFA (b), Diglicerida (c) dan Monoglicerida (d) pada Jumlah Mikroorganisme sebanyak 10^{12} sel/ml mixture.

Pada penelitian ini kadar trigliserida mengalami kenaikan mulai hari pertama hingga hari kedua. Hasil analisa pada hari kedua yang ditunjukkan pada **Gambar.IV.6** dimana kadar trigliserida mengalami kenaikan mencapai 98,02% (*R.Oryzae*) dan 98,72 % (*L. plantarum*). Sedangkan kadar FFA (*Free Fatty Acid*), digliserida dan monogliseridamenurun hingga 1,15% (*R.Oryzae*) dan 0.51% (*L. plantarum*). Pada kadar digliserida dan monogliserida juga menurun dengan kadar digliserol sebesar 0,45 % (*R.Oryzae*) dan 0,72% (*L. plantarum*) serta kadar monogliserida sebesar 0,38%(*R.Oryzae*) dan 0,16% (*L. plantarum*).

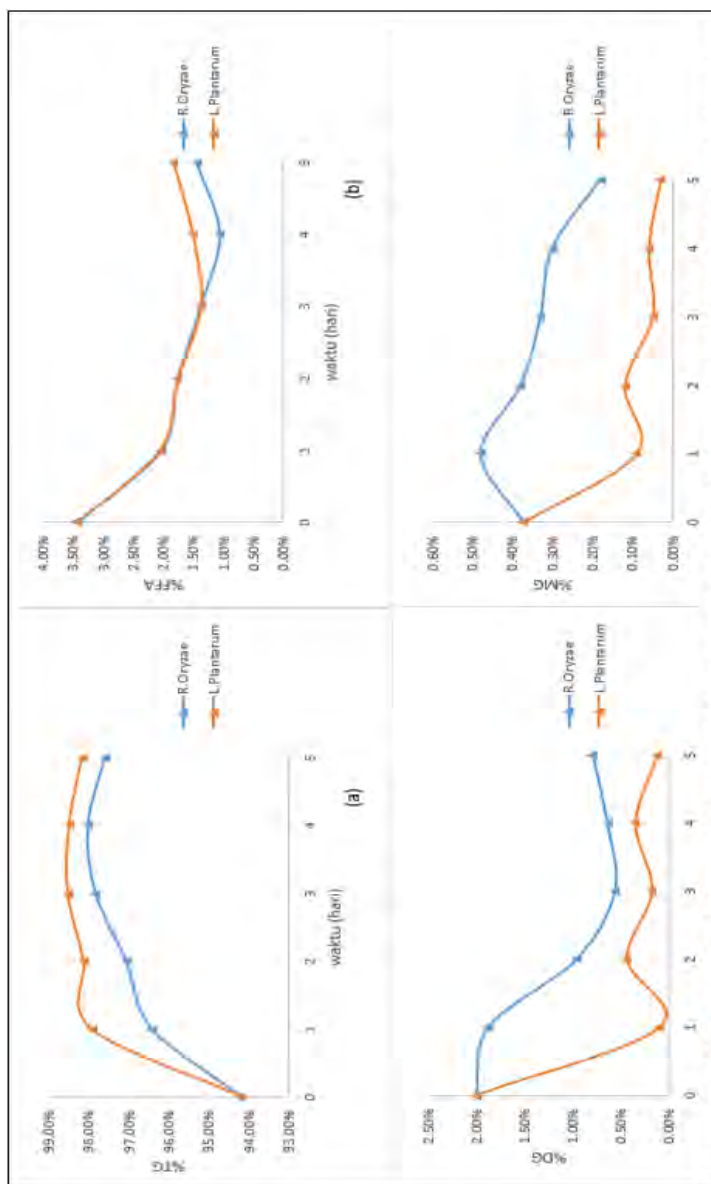
Namun pada penelitian ini juga kadar trigliserida juga menurun pada saat hari keempat hingga hari kelima hari ketiga hari keempat. Hasil analisa hari keempat kadar trigliserida mengalami penurunan mencapai 95.12% (*R.Oryzae*) dan 97,72% (*L. plantarum*). Sedangkan kadar FFA(*Free Fatty Acid*) naik hingga 1,07% (*R.Oryzae*) dan 1.12% (*L. plantarum*). Pada kadar digliserida dan monogliserida juga naik dengan kadar digliserol sebesar 1,16 % (*R.Oryzae*) dan 0,64% (*L. plantarum*) serta kadar monogliserida sebesar 1,07%(*R.Oryzae*) dan 0,45% (*L. plantarum*).



Gambar.IV.7 Grafik Pengaruh Waktu hidrolisa terhadap Kadar Trigliserida (a), FFA (b), Digliserida (c) dan Monogliserida (d) pada Jumlah Mikroorganisme sebanyak 5.10^{12} sel/ml mixture.

Pada penelitian ini kadar trigliserida mengalami kenaikan mulai hari pertama hingga hari keempat. Hasil analisa pada hari keempat, yang ditunjukkan pada **Gambar.IV.7** yaitu kadar trigliserida mengalami kenaikan mencapai 97,58% (*R.Oryzae*) dan 98,9 % (*L. plantarum*). Sedangkan kadar FFA(*Free Fatty Acid*) turun hingga hari kedua mencapai 1,68% (*R.Oryzae*) dan 0.54% (*L. plantarum*). Pada kadar digliserida dan monogliserida juga menurun hingga hari ketiga dengan kadar digliserida sebesar 0,36 % (*R.Oryzae*) dan 0,6% (*L. plantarum*) serta kadar monogliserida sebesar 0,1% (*R.Oryzae*) dan 0,51% (*L. plantarum*).

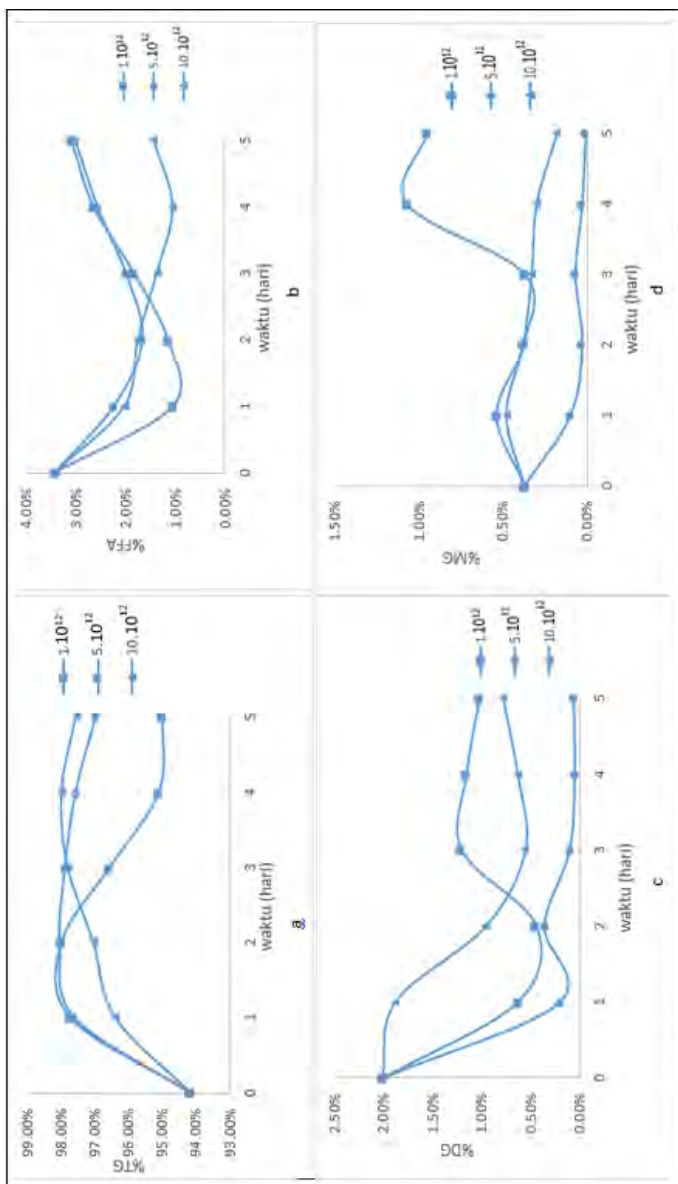
Namun pada penelitian ini juga kadar trigliserida juga menurun pada saat hari keempat hingga hari kelima saat hari keempat hingga hari kelima. Hasil analisa hari keempat, kadar trigliserida mengalami penurunan mencapai 95.12% (*R.Oryzae*) dan 97,72% (*L. plantarum*). Sedangkan kadar FFA(*Free Fatty Acid*) naik hingga 1,07% (*R.Oryzae*) dan 1.12% (*L. plantarum*). Pada kadar digliserida dan monogliserida juga naik dengan kadar digliserol sebesar 1,16 % (*R.Oryzae*) dan 0,64% (*L. plantarum*) serta kadar monogliserida sebesar 1,07%(*R.Oryzae*).



Gambar.IV.8 Grafik Pengaruh Waktu hidrolisa terhadap Kadar Triglicerida (a), FFA (b), Digliserida (c) dan Monogliserida (d) pada Jumlah Mikroorganisme sebanyak 10^{13} sel/ml mixture.

Pada penelitian ini terjadi kenaikan kadar trigliserida mulai hari pertama hingga hari keempat. Hasil analisa pada hari keempat, yang ditunjukkan pada **Gambar.IV.8** yaitu kadar trigliseida mengalami kenaikan mencapai 98,01% (*R.Oryzae*) dan 98,48 % (*L. plantarum*). Sedangkan kadar FFA(*Free Fatty Acid*) turun hingga hari ketiga mencapai 1,38% (*R.Oryzae*) dan 1,38% (*L. plantarum*). Pada kadar digliserida dan monogliserida juga menurun hingga hari keempat dengan kadar digliserol sebesar 0,64 % (*R.Oryzae*) dan 0,35% (*L. plantarum*) serta kadar monogliserida sebesar 0,3%(*R.Oryzae*) dan 0,06% (*L. plantarum*).

Namun pada penelitian ini juga kadar triglerida juga menurun pada saat hari keempat hingga hari kelima. Hasil anlisa hari kelima, kadar trigliserida mengalami penurunan mencapai 97,58% (*R.Oryzae*) dan 98,16% (*L. plantarum*). Sedangkan kadar FFA (*free fatty acid*) naik hingga 0,79% (*R.Oryzae*) dan 1.83% (*L. plantarum*). Pada kadar digliserida dan monogliserida juga naik dengan kadar digliserol sebesar 1,16 % (*R.Oryzae*) dan 0,64% (*L. plantarum*) serta kadar monogliserida sebesar 0,12%(*R.Oryzae*) dan 0.03% (*L. plantarum*).

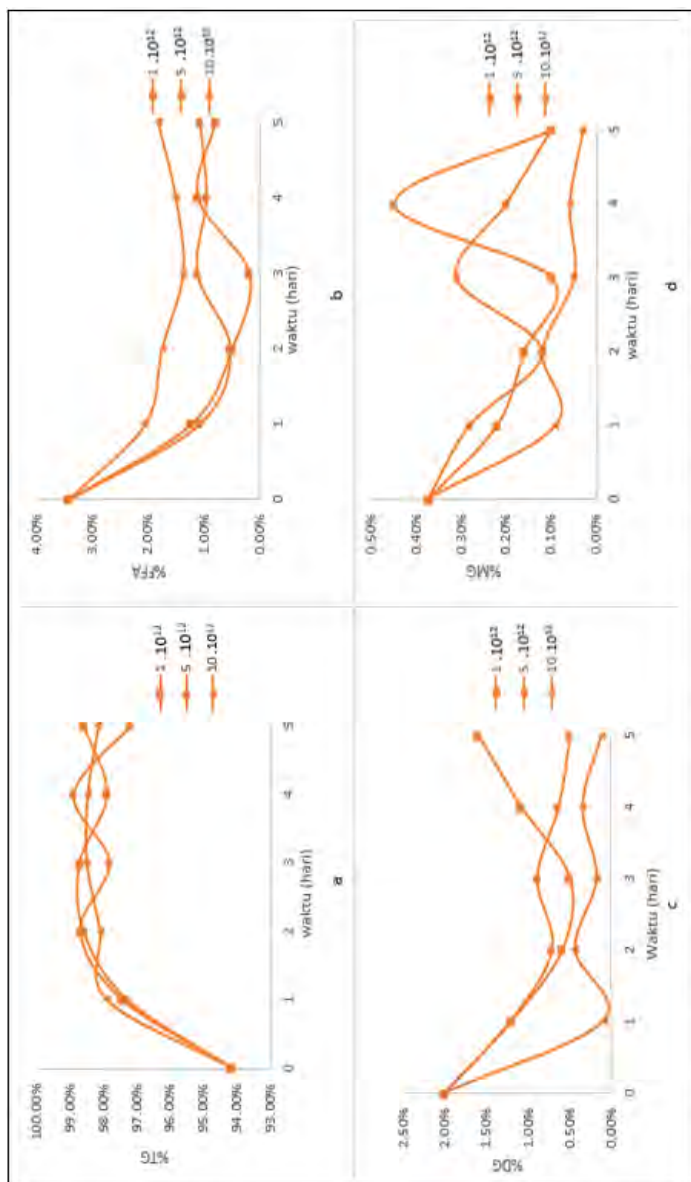


Gambar IV.9 Grafik Pengaruh Jumlah Mikroorganisme Terhadap (a) Kadar Triglicerida, (b) FFA, (c) Diglicerida dan (d) Monoglicerida menggunakan *R.oryzae*.

Pada **Gambar IV.9** merupakan grafik pengaruh jumlah mikroorganisme terhadap trigliserida, digliserida, monogliserida dan asam lemak pada hari pertama hidrolisa. Pada hasil analisa yang ditunjukkan pada **Gambar IV.9** didapatkan kadar trigliserida mengalami kenaikan hingga hari kedua yaitu 98,02% (10^{12} sel/ml), 98,05% (5.10^{12} sel/ml) dan 97,06 % (10.10^{12} sel/ml). Sedangkan kadar FFA (*free fatty acid*) digliserida dan monogliserida mengalami penurunan selama proses hidrolisa. Kadar FFA (*free fatty acid*) pada hari kedua yaitu 1,15% (10^{12} sel/ml), 1,68% (5.10^{12} sel/ml) dan 1,76 % (10.10^{12} sel/ml). Dan kadar digliserida pada hari kelima yaitu 1,03% (10^{12} sel/ml), 0,06% (5.10^{12} sel/ml) dan 0,79 % (10.10^{12} sel/ml). Sedangkan kadar monogliserida pada hari kelima yaitu 0,95% (10^{12} sel/ml), 0,01% (5.10^{12} sel/ml) dan 0,18 % (10.10^{12} sel/ml).

Namun pada **Gambar IV.9** saat hari kedua hingga hari kelima kadar trigliserida mengalami penurunan yaitu 95,01% (10^{12} sel/ml), 96,98% (5.10^{12} sel/ml) dan 97,58 % (10.10^{12} sel/ml). Sedangkan kadar FFA (*free fatty acid*) mengalami kenaikan hingga hari kelima. Kadar FFA (*free fatty acid*) pada hari kelima yaitu 3,01% (10^{12} sel/ml), 3,02% (5.10^{12} sel/ml) dan 1,44 % (10.10^{12} sel/ml).

Berdasarkan **Gambar IV.9** kenaikan trigliserida dan penurunan FFA (*free fatty acid*) disebabkan adanya proses esterifikasi. Sedangkan kenaikan digliserida dan monogliserida disebabkan reaksi hidrolisa trigliserida yang tidak sempurna atau reaksi balik dari esterifikasi yang ditunjukkan pada **Gambar IV.11**.



Gambar IV.10 Grafik Pengaruh Jumlah Mikroorganisme Terhadap (a) Kadar Trigliserida, (b) FFA, (c) Digliserida dan (d) Monogliserida menggunakan *L.plantarum*

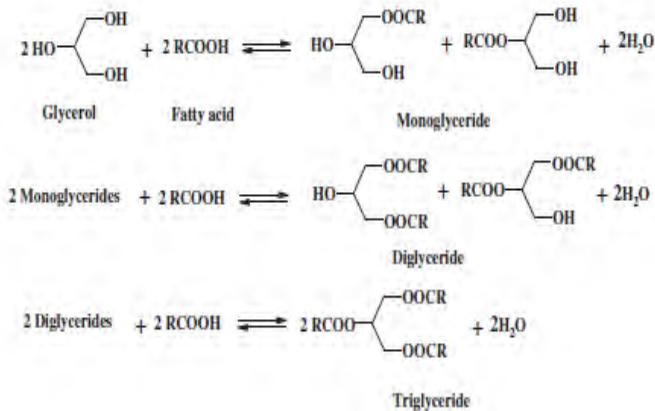
Pada **Gambar IV.10** merupakan grafik pengaruh jumlah mikroorganisme terhadap trigliserida, digliserida, monogliserida dan FFA (*free fatty acid*) pada proses hidrolisa. Pada hasil analisa yang ditunjukkan pada **Gambar IV.10** didapatkan kadar trigliserida mengalami kenaikan hingga hari ketiga yaitu 98,72% (10^{12} sel/ml), 97,84% (5.10^{12} sel/ml) dan 98,51 % (10.10^{12} sel/ml). Sedangkan kadar FFA (*free fatty acid*) digliserida dan monogliserida mengalami penurunan selama proses hidrolisa. Kadar FFA (*free fatty acid*) pada hari kedua yaitu 0,72% (10^{12} sel/ml), 0,54% (5.10^{12} sel/ml) dan 1,76 % (10.10^{12} sel/ml). Dan kadar digliserida pada hari kedua yaitu 0,72% (10^{12} sel/ml), 0,6% (5.10^{12} sel/ml) dan 0,44% (10.10^{12} sel/ml). Sedangkan kadar monogliserida pada hari kedua yaitu 0,16% (10^{12} sel/ml), 0,12% (5.10^{12} sel/ml) dan 0,44 % (10.10^{12} sel/ml mixture).

Namun pada **Gambar IV.10** saat hari kedua hingga hari kelima kadar trigliserida mengalami penurunan yaitu 96 % (10^{12} sel/ml), 97,0% (5.10^{12} sel/ml) dan 98,16 % (10.10^{12} sel/ml). Sedangkan kadar FFA (*free fatty acid*) mengalami kenaikan hingga hari kelima. Kadar FFA (*free fatty acid*) pada hari kelima yaitu 0,81% (10^{12} sel/ml mixture), 1,08% (5.10^{12} sel/ml mixture) dan 1,83 % (10.10^{12} sel/ml mixture).

Berdasarkan **Gambar IV.10** kenaikan trigliserida dan penurunan FFA (*free fatty acid*) disebabkan adanya proses esterifikasi . Sedangkan kenaikan digliserida dan monogliserida disebabkan reaksi hidrolisa trigliserida yang tidak sempurna atau reaksi balik dari esterifikasi yang ditunjukkan pada **Gambar IV.11**

Berdasarkan **Gambar IV.6, Gambar IV.7, Gambar IV.8, Gambar IV.9 dan Gambar IV.10** terlihat bahwa terjadi proses dua proses yaitu reaksi esterifikasi dan reaksi hidrolisa. Reaksi esterifikasi menyebabkan kadar trigliserida meningkat dan kadar FFA(*free fatty acid*) menurun. Reaksi esterifikasi merupakan reaksi balik dari reaksi hidrolisa trigliserida. Sedangkan proses hidrolisa menyebabkan kadar trigliserida menurun dan kadar FFA(*free fatty acid*) meningkat. Selain itu reaksi hidrolisa yang

tidak sempurna dapat menyebabkan kadar digliserida dan monogliserida meningkat.



Gambar IV.11 Reaksi Esterifikasi

Pada **Gambar IV.11** ditunjukkan reaksi esterifikasi. Berdasarkan penelitian sebelumnya menurut Mehejabeen dkk (2011) menyatakan semakin besar konversi FFA (*free fatty acid*) maka semakin besar terbentuknya trigliserida pada reaksi esterifikasi. Kemungkinan lain penurunan FFA (*free fatty acid*) juga disebabkan adanya penurunan aktivitas enzim lipase yang disebabkan senyawa penghambat dari produk samping reaksi. Sedangkan menurut Galliard dkk (1971) aktivitas lipase kentang mengalami penurunan aktivitas karena produksi senyawa penghambat aktivitas enzim atau produk samping dari hasil reaksi atau terjadi inaktivasi enzim dengan semakin lama hidrolisa. Dan menurut Koda dkk (2011) menyatakan bahwa *whole cell* biokatalis memerlukan air 5-15% untuk bertahan hidup. Hal tersebut yang membuat kadar trigliserida meningkat dan kadar FFA (*free fatty acid*) menurun. Sedangkan kenaikan digliserida dan monogliserida juga disebabkan karena reaksi hidrolisa yang tidak sempurna. Dari reaksi balik pada **Gambar IV.11** dapat menghasilkan digliserida

dan monogliserida yang menyebabkan kadar digliserida dan monogliserida .

Dari **Gambar IV.9** dan **Gambar IV.10** menunjukkan pengaruh jumlah mikroorganisme terhadap proses hidrolisa. Dengan variabel jumlah mikroorganisme sebanyak 1×10^{12} sel/ml mixture, 5×10^{12} sel/ml mixture dan 10^{13} sel/ml mixture tidak menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap proses hidrolisa trigliserida.

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pada saat kadar FFA (*free fatty acid*) $< 1\%$ dan kadar digliserida $< 0,45\%$ akan terjadi proses hidrolisa. Namun untuk proses hidrolisa dengan menggunakan biokatalis *whole cell R.oryzae* lebih baik untuk proses hidrolisa sedangkan *L.plantarum* lebih baik untuk proses esterifikasi.

Kandungan FFA yang tinggi dapat mempengaruhi reaksi. Pada penelitian ini, proses hidrolisa tidak berjalan sempurna atau bahkan dapat terjadi reaksi esterifikasi karena adanya kandungan FFA yang tinggi. Hal ini analog dengan proses transesterifikasi pada pembuatan biodiesel. Menurut Boey (2012) dan Elsheik (2011) pada proses transesterifikasi produksi biodiesel dengan penggunaan enzim lipase sebagai katalis, kandungan FFA $> 1\%$ dapat menyebabkan terjadinya reaksi penyabunan.

Dalam penggunaan *whole-cell* sebagai biokatalis perlu memperhatikan kebutuhan air yang digunakan. Selain digunakan dalam reaksi hidrolisa, air juga diperlukan untuk kebutuhan mikroorganisme untuk hidup. Menurut Koda dkk (2010) *whole-cell* biocatalyst membutuhkan 5-15% (g/g) air.

Umumnya, proses penggunaan *whole-cell* sebagai biokatalis dalam proses hidrolisa membutuhkan waktu yang lebih lama jika dibandingkan dengan penggunaan enzim komersial. Saat ini penggunaan enzim komersial sudah dapat diimobilisasi. Hal ini tentu akan menambah nilai ekonomi enzim komersial. Meskipun harganya mahal, namun dapat dipakai berkali-kali.

Penggunaan *whole-cell* sebagai biokatalis masih perlu penelitian lebih lanjut. Hal ini perlu dilakukan untuk menambah nilai ekonomi dari penggunaan *whole-cell* itu sendiri.

APPENDIKS

A. Memperkirakan Jumlah Sel

Menurut Caprette (2007) metode menghitung jumlah sel menggunakan suatu alat yang disebut dengan *counting chamber* (ruang hitung). Alat ini dapat digunakan untuk menghitung jumlah sel per unit volume. Tipe *counting chamber* yang paling banyak digunakan adalah *haemocytometer*.

Dilakukan perhitungan dengan tiga kali run pada setiap kotak.

A				B
		C		
D				E

$$\text{Jumlah sel/mL} = \frac{\text{jumlah} \frac{\text{sel}}{\text{kotak}} (\text{rata-rata}) \times 1000 \times fp}{0,0025 \text{ mm}^2 \times 0,1}$$

Keterangan :

Fp= faktor pengenceran

Jumlah Sel *Lactobacillus plantarum*

jam ke-	0										
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	10	15	18	27	23	93	18.6	465	4650	10	46500000
2	18	22	23	21	25	109	21.8	545	5450	10	54500000
3	21	24	16	22	23	106	21.2	530	5300	10	53000000
rata-rata											51333333.3
jam ke-	2										
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	16	16	16	20	17	85	17	425	4250	10	42500000
2	17	24	25	15	13	94	18.8	470	4700	10	47000000
3	16	16	18	12	22	84	16.8	420	4200	10	42000000
rata-rata											43833333.3

jam ke-	4										
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	12	8	18	12	22	72	14.4	360	3600	100	360000000
2	22	10	9	22	18	81	16.2	405	4050	100	405000000
3	18	10	12	9	8	57	11.4	285	2850	100	285000000
rata-rata											350000000
jam ke-	6										
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	20	12	8	12	16	68	13.6	340	3400	100	340000000
2	9	14	18	22	10	73	14.6	365	3650	100	365000000
3	8	19	22	13	16	78	15.6	390	3900	100	390000000
rata-rata											365000000

jam ke-	8										
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	21	80	65	55	38	259	51.8	1295	12950	100	1295000000
2	51	10	35	42	23	161	32.2	805	8050	100	805000000
3	18	19	42	28	21	128	25.6	640	6400	100	640000000
rata-rata										913333333	
jam ke-	10										
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	21	22	20	18	24	105	21	525	5250	100	525000000
2	19	18	30	21	13	101	20.2	505	5050	100	505000000
3	24	14	22	19	15	94	18.8	470	4700	100	470000000
rata-rata										500000000	

jam ke-	12										
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	9	3	7	16	5	40	8	200	2000	1000	2000000000
2	11	12	12	10	8	53	10.6	265	2650	1000	2650000000
3	4	1	3	22	2	32	6.4	160	1600	1000	1600000000
rata-rata											2083333333
jam ke-	14										
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	4	17	23	7	20	71	14.2	355	3550	1000	3550000000
2	12	8	6	15	18	59	11.8	295	2950	1000	2950000000
3	2	16	3	1	11	33	6.6	165	1650	1000	1650000000
rata-rata											2716666667

jam ke-	16										
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	5	13	5	12	8	43	8.6	215	2150	10000	2.15X 10 ¹⁰
2	8	8	15	4	16	51	10.2	255	2550	10000	2.55X 10 ¹⁰
3	12	7	7	7	12	45	9	225	2250	10000	2.25X 10 ¹⁰
rata-rata											2.3167X 10 ¹⁰
jam ke-	18										
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	14	12	4	29	20	79	15.8	395	3950	10000	3.95X 10 ¹⁰
2	23	23	15	2	2	65	13	325	3250	10000	3.25X 10 ¹⁰
3	24	16	20	24	22	106	21.2	530	5300	10000	5.3X 10 ¹⁰
rata-rata											4.1667X 10 ¹⁰

jam ke-	20										
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	1	9	6	5	2	23	4.6	115	1150	100000	1.15×10^{11}
2	12	3	9	4	12	40	8	200	2000	100000	2×10^{11}
3	11	9	16	8	4	48	9.6	240	2400	100000	2.4×10^{11}
rata-rata											1.85×10^{11}
jam ke-	22										
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	20	14	22	29	25	110	22	550	5500	100000	5.5×10^{11}
2	7	24	24	12	18	85	17	425	4250	100000	4.25×10^{11}
3	23	23	12	22	33	113	22.6	565	5650	100000	5.65×10^{11}
rata-rata											5.1333×10^{11}

jam ke-	24										
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	22	14	22	29	25	112	22.4	560	5600	100000	5.6X 10 ¹¹
2	22	24	32	12	38	128	25.6	640	6400	100000	6.4X 10 ¹¹
3	23	33	12	22	33	123	24.6	615	6150	100000	6.15X 10 ¹¹
rata-rata											6.05X 10 ¹¹
jam ke-	26										
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	23	20	19	25	29	116	23.2	580	5800	100000	5.8X 10 ¹¹
2	37	22	25	12	26	122	24.4	610	6100	100000	6.1X 10 ¹¹
3	33	32	30	33	23	151	30.2	755	7550	100000	7.55X 10 ¹¹
rata-rata											6.4833X 10 ¹¹

jam ke-	28										
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	23	30	23	33	17	126	25.2	630	6300	100000	6.3X 10 ¹¹
2	37	0	37	36	14	124	24.8	620	6200	100000	6.2X 10 ¹¹
3	33	23	30	45	12	143	28.6	715	7150	100000	7.15X 10 ¹¹
rata-rata											6.55X 10 ¹¹
jam ke-	28										
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	20	19	23	33	22	117	23.4	585	5850	100000	5.85X 10 ¹¹
2	37	23	35	23	24	142	28.4	710	7100	100000	7.1X 10 ¹¹
3	30	20	30	30	22	132	26.4	660	6600	100000	6.6X 10 ¹¹
rata-rata											6.5167X 10 ¹¹

jam ke-	jml bakteri	Standart deviasi
0	5.13×10^{07}	4252450.274
2	4.38×10^{07}	2753785.274
4	3.50×10^{08}	60621778.26
6	3.65×10^{08}	25000000
8	9.13×10^{08}	340673352.8
10	5.00×10^{08}	27838821.81
12	2.08×10^{09}	529937103.2
14	2.72×10^{09}	971253485.6
16	2.32×10^{10}	2081665999
18	4.17×10^{10}	10420332688
20	1.85×10^{11}	63835726674
22	5.13×10^{11}	76865683717
24	6.05×10^{11}	40926763859

26	6.48333×10^{11}	93585967609
28	6.55×10^{11}	52201532545
30	6.51667×10^{11}	62915286961

Jumlah Sel *Rhizopus oryzae*

Hari ke-	0										
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	3	3	6	4	1	17	3.4	85	850	1	850000
2	1	0	3	5	1	10	2	50	500	1	500000
3	2	2	6	6	4	20	4	100	1000	1	1000000
rata-rata											783333.333
Hari	1										

ke-											
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	6	3	3	2	1	15	3	75	750	1	750000
2	3	2	5	2	3	15	3	75	750	1	750000
3	5	7	1	1	6	20	4	100	1000	1	1000000
rata-rata										833333.333	
Hari ke-	2										
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	11	17	9	2	9	48	9.6	240	2400	10	24000000
2	2	14	15	12	11	54	10.8	270	2700	10	27000000
3	10	7	10	3	13	43	8.6	215	2150	10	21500000
rata-rata										24166666.7	

Hari ke-	3										
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	6	1	7	1	7	22	4.4	110	1100	100	110000000
2	5	5	2	2	5	19	3.8	95	950	100	95000000
3	1	6	1	8	12	28	5.6	140	1400	100	140000000
rata-rata											115000000
Hari ke-	4										
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	12	10	7	12	15	56	11.2	4480	44800	1000	4.48×10^{10}
2	13	1	16	12	17	59	11.8	4720	47200	1000	4.72×10^{10}
3	22	26	8	6	9	71	14.2	5680	56800	1000	5.68×10^{10}
rata-rata											4.96×10^{10}

Hari ke-	5										
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	13	9	6	8	11	47	9.4	3760	37600	1000	3.76×10^{10}
2	13	14	9	11	22	69	13.8	5520	55200	1000	5.52×10^{10}
3	6	25	10	9	29	79	15.8	6320	63200	1000	6.32×10^{10}
rata-rata											5.2×10^{10}
Hari ke-	6										
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	24	15	25	4	17	85	17	6800	68000	1000	6.8E+10
2	12	11	12	15	26	76	15.2	6080	60800	1000	6.08E+10
3	28	12	23	11	13	87	17.4	6960	69600	1000	6.96E+10
rata-rata											6.6133E+10

Hari ke-	7										
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	24	35	33	24	27	143	28.6	11440	114400	1000	1.144×10^{11}
2	22	29	38	25	26	140	28	11200	112000	1000	1.12×10^{11}
3	29	32	23	22	33	139	27.8	11120	111200	1000	1.112×10^{11}
rata-rata											1.1253×10^{11}
Hari ke-	8										
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	23	16	10	8	14	71	14.2	5680	56800	10000	5.68×10^{11}
2	8	10	25	10	9	62	12.4	4960	49600	10000	4.96×10^{11}
3	10	17	12	10	26	75	15	6000	60000	10000	6×10^{11}
rata-rata											5.5467×10^{11}

Hari ke-	9										
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	22	26	27	22	20	117	23.4	9360	93600	10000	9.36×10^{11}
2	19	21	30	27	28	125	25	10000	100000	10000	1×10^{12}
3	18	28	28	32	18	124	24.8	9920	99200	10000	9.92×10^{11}
rata-rata											9.76×10^{11}
jam ke-	10										
run	a	b	c	d	e	jml tot sel	jml sel/kotak	jml sel/mm2	jml sel/mm3	fp	jml sel/ml
1	22	20	22	30	26	120	24	9600	96000	10000	9.6×10^{11}
2	19	18	22	25	19	103	20.6	8240	82400	10000	8.24×10^{11}
3	15	13	7	23	10	68	13.6	5440	54400	10000	5.44×10^{11}
rata-rata											9.6×10^{11}

Hari ke-	jml bakteri	Standart deviasi
0	7.83×10^5	256580.07
1	8.33×10^5	144337.57
2	2.42×10^7	2753785.3
3	1.15×10^8	22912878
4	4.96×10^{10}	6.35×10^9
5	5.20×10^{11}	1.31×10^{10}
6	6.61×10^{11}	4.688×10^9
7	1.13×10^{11}	1.665×10^9
8	5.55×10^{11}	5.327×10^{10}
9	9.76×10^{11}	3.487×10^{10}
10	9.6×10^{11}	2.121×10^{11}

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dan analisa yang dilakukan , dapat disimpulkan bahwa:

1. Penggunaan *R. Oryzae* dari lebih efektif dibandingkan *L. Plantarum* untuk proses hidrolisa trigliserida dari NPLF minyak nyamplung.
2. Jumlah *whole-cell microbial* tidak berpengaruh pada proses.
3. Lama waktu hidrolisa akan mempengaruhi kadar *FFA (free fatty acid)* yang terbentuk karena semakin lama proses hidrolisa dapat menyebabkan adanya reaksi balik ataupun reaksi esterifikasi, sehingga kadar trigliserida akan naik dan kadar FFA justru turun.

V.2 Saran

1. Sebaiknya dilakukan pretreatment untuk menurunkan kadar Monogliserida ,Digliserida dan FFA awal pada minyak karena hal tersebut dapat mempengaruhi proses hidrolisa.
2. Sebaiknya memperhatikan pemenuhan sumber nutrisi tiap jenis mikroorganisme.
3. Memperhatikan rasio minyak dan air yang dapat mempengaruhi selama proses hidrolisa.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggraini, D., Della Istianingsih, Setiyo Gunawan. 2014. *Pengaruh Prosentase Solvent Non Polar dalam Campuran Pelarut terhadap Pemisahan Senyawa Non Polar dari Minyak Nyamplung (Calophyllum Inophyllum)*. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Aparamarta, Hakun W., Teguh Saputra, Anggita Claratika, Yi-Hsu Ju, dan Setiyo Gunawan. 2016. *Separation and Purification of Triacylglycerols from Nyamplung (Calophyllum inophyllum) Oil by Batchwise Solvent Extraction*. Industrial and Engineering Chemistry Research. 2016, 55, 3113–3119.
- Atabani, A.E., Aldara da Silva Cesar. 2014. *Calophyllum inophyllum L. – A prospective non-edible biodiesel feedstock. Study of biodiesel production, properties, fatty acid composition, blending and engine performance*. Renewable and Sustainable Energy Reviews 37 (2014) 644–655
- Ban K, Kaieda M, Matsumoto T, Kondo A, dan Fukuda H. 2001. *Whole-cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing Rhizopus oryzae cells immobilized within biomass support particles*. Biochem. Eng. J. (8):39–43.
- Carrasco, F. (2009). *Ingredientes Cosméticos. Diccionario de Ingredientes* (4th ed.). p. 428. ISBN 978-84-613-4979-1.
- Cechinel Filho, V., Junior, I.F.S., Zacchino, S.A., Lima, J.C.S., and Martins, DTO., 2009. *Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado*. Brazilian Journal of Pharmacognory 19 (1B): 242-248.
- Christie, William W. 2013. AOCs Lipid Library. *Lipid Structure and Function*. [Online] July 25, 2013. [Cited: May 11, 2016.] <http://lipidlibrary.aocs>.

org/Primer/content.cfm?ItemNumber=39371&navItemNumber=19200.

- Crane, S., Aurore, G., Joseph. 2005. *Composition of Fatty Acids Triacylglycerols and unsaponifiable matter in Calophyllum calaba L. oil from guadeloupe*. Phytochemistry 66:1825-1831.
- Day, R.A.Jr. and Underwood, A.L., 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Jakarta: Erlangga
- Deng, Y. 2012. *Acaricidal activity of petroleum ether extract of neem (Azadirachta indica) oil and its four fractions separated by column chromatography against Sarcoptes scabiei var. cuniculi larvae in vitro*. Experimental Parasitology 130, 475–477.
- Dweck, A.C., dan Meadows, T., 2002. *Tamanu*. International Journal of Cosmetic Science 2002, 24: 1-8.
- Darmstadt, GL; Mao-Qiang, M; Chi, E; Saha, SK; Ziboh, VA; Black, RE; Santosham, M; Elias, PM. 2002. *Impact of topical oils on the skin barrier: possible implications for neonatal health in developing countries*. Acta Paediatrica 91
- Fukuda H, Hama S, Tamalampudi S, dan Noda H. 2008. *Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production*. Trends in Biotechnology: 26-12.
- Fessenden, J.R., 1986. *Kimia Organik Edisi Ketiga Jilid 1*. Jakarta: Erlangga.
- Friday, J.B., dan Okano, D., 2006. *Calophyllum inophyllum (kamani)*. Species Profiles for Pacific Island Agroforestry.
- Gianisa. 2015. Laporan Trigliserida dan Kolesterol. http://www.academia.edu/5536737/LAPORAN_TG_and_KOLESTEROL. Diakses pada 18 Januari 2016 pukul 13.00 WIB.
- Giesen, W., Wulfraat, S., Zierem, M., dan Scholten, L., 2006. *Mangrove Guide Book for Southeast Asia Food*

- and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations. Thailand: Wetlands International Dharmasam Co., Ltd.,
- Gofferje, G., Stabler A., Thomas Herfellner. 2014. *Kinetics of enzymatic esterification of glycerol and free fatty acids in crude Jatropha oil by immobilized lipase from Rhizomucor miehei*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 107 (2014) 1–7.
- Gunawan, S., Jeng, B.R., Ju, Y.H., 2013. *Regeneration of Silica Gel for Separation of Squalene and Steryl Esters from Soybean Oil Deodorizer Distillate*. International Review of Chemical Engineering Vol. 5, N.2.
- Gunawan, S., Fabian, C., Ju, Y.H., 2008. *Isolation and Purification of Fatty Acid Steryl Esters from Soybean Oil Deodorizer Distillate*. Ind-Eng-Chem Rex (2008) 47: 7013-7018.
- Hargono dan Haryani, K. 2010. *Pengaruh Jenis Solvent dan Variasi Tray pada Pengambilan Minyak Nyamplung dengan Metode Ekstraksi Kolom*. Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia “Kejuangan”. ISSN 1693-4393.
- Hasna, syarifah. 2012. *Studi Esterifikasi Asam Lemak hasil Hidrolisis Minyak Kelapa dengan Glukosa Menggunakan Lipase Candida rugosa EC 3.1.1.3 terimobilisasi pada Matriks Ca-Alginat*. Depok: Universitas Indonesia.
- Hemavathy, J., dan Prabhakar, J.V., 1990. *Lipid Composition of Chalophyllum Inophyllum Kernel. Discipline of Convenience foods and Confectionery*. 67:955-957.
- Iskandari, Anna. 2010. *Isolasi dan Elusidasi Struktur Quercetrin dari Daun Nyamplung*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret Surakarta.

- Ismail, A.F., Khulbe, K.C., dan Matsuura, T. 2015. *Gas Separation Membranes: Polymeric and Inorganic*. Switzerland: Springer.
- I a e l Soares, acarias T vora, Rodrigo Patera Barcelos dan Suzymeire Baroni (2012). *Microorganism- Produced Enzymes in the Food Industry, Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry*Industry, Dr. Benjamin Valdez (Ed.), ISBN: 978-953-307-916-5, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/scientific-health-and-social-aspects-of-the-food-industry/microorganismproduced-enzymes-in-the-food-industry>.
- Ketaren. 2005. *Minyak dan Lemak Pangan*. Jakarta: UI Press.
- Kirk, Ole., Vedel, Torben., Crone, Clause. 2002. *Industrial Enzyme Application*. Current opinion on biotechnology, 13:345-351.
- Koda R, Numata T, Hama S, Tamalampudi S, Nakashima K, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H, dan Kondo A . 2010. *Ethanolysis of Rapeseed oil to produce biodiesel fuel catalyzed by Fusarium heterosporum lipase-expressing fungus immobilized whole-cell biocatalyst*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 66: 101-104
- Lehninger, A. L. 1982. *Dasar-Dasar Biokimia*. Terjemahan, dari principles of biochemistry, oleh Thenawidjaja, M. Penerbit Erlangga, Jakarta:xv+369 hlm.
- Li, L., Du, W., Liu, D., Wang, L., Li, Z., 2006. *Lipase-catalysed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium*. J. Mol. Catal. B 43, 58–62.
- Lim, T.K., 2012. *Edible Medicinal and Non Medicinal Plants Volume 2: Fruits*. Netherlands: Springer Netherlands.
- Ling, K.H., Kian, C.T., dan Hoon, T.C., 2009. *A Guide to Medicinal Plant*. Singapore World Scientific.

- Kotwal Mehejabeen., S.S Despandhe.,Srinivas. 2011. *Esterification of fatty acids with glycerol over Fe–Zn double-metal cyanide catalyst*. Catalysis Communications 12 (2011) 1302–1306
- Ozturk,Banu. 2012. *Immobilization of Lipase from Candida rugosa on Hydrophobic and Hidrophylic supports*. Dzmir Institute of Technology, Turkey.
- Praswasti PDK Wulan, Muhammad Titis Rejoso, Heri Hermansyah. *Reaksi Hidrolisis Minyak Zaitun Menggunakan Lipase Rhizopus oryzae yang di Imobilisasi Melalui Metode Adsorpsi*. Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia
- Robert J. Whitehurst, Barry A. Law.2002.*Enzymes in Food Technology*. Sheffield: Sheffield Academic Press Ltd
- Rohit Sharmaa, Yusuf Chistib, Uttam Chand Banerjee. 2001. *Production, purification, characterization, and applications of lipases*. Biotechnology Advances 19 (2001) 627–662
- R. Gupta, N. Gupta, P. Rathi. 2004.*Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties*. Microbiol Biotechnol 64: 763–781
- Sadek, P. 2002. *The HPLC Solvent Guide*. United States of America: Wiley of Interscience
- Sevil Yücel, Pınar Ter ioğlu dan Didem Özçimen. 2013.*Lipase Applications in Biodiesel Production*.
- Sharma,Aditi., Satyendra. 2013. *Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids production*. Catalysis Today 207 (2013) 93– 100.
- Smolinske, Susan C. (1992). *Handbook of Food, Drug, and Cosmetic Excipients*. pp. 247–8. ISBN 978-0-8493-3585-3.
- Tortora, J Gerard., Berdella Funke., Christine L. 2010. *Microbiology: an Introduction Tenth Edition*.

- Penerbit Pearson education, Inc., San Fransisco ISBN 10: 0-321-55007-2; ISBN 13: 978-0-321-55007-1
- V. Ramachandra Murty, Jayadev Bhat, dan P. K. A. Muniswaran. 2002. *Hydrolysis of Oils by Using Immobilized Lipase Enzyme: A Review Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 7: 57-66.
- Venkanna, BK. dan C Venkataramana Reddy. 2009. *Biodiesel production and optimization from Calophyllum inophyllum linn oil (honne oil)–A three stage method*. Journal Bioresource Technology, 21: 5122-5125.
- Yimdjo, M.C., Azebaze A.G., Nkengfack A.E., Meyer, A.M., Bodo, B., dan Fomum, Z.T., 2004. *Antimicrobial and Cytotoxic Agents from Calophyllum inophyllum*. Phytochemistry. 65: 2789-2795.
- Yücel Sevil, Pınar Ter ioğlu dan Didem Özçimen. 2013. *Lipase Applications in Biodiesel Production*. Intech: 209-25 .<http://dx.doi.org/10.5772/52662>
- Yunitasari, E.P., 2008. *Pengaruh Jenis Solvent dan Variasi Tray pada Pengambilan Minyak Nyamplung dengan Metode Ekstraksi Kolom*. Semarang: Universitas Diponegoro.